

# Eindrapport LNV bestek Duurzame viskweek

Catarina Martins<sup>1</sup>, Edward Schram<sup>2</sup>, Ep Eding<sup>1</sup>, Jan van der Heul<sup>2</sup>, Hans van de Vis<sup>2</sup>, Wout Abbink<sup>2</sup>, Jeroen Jansen<sup>2</sup> en Oliver Schneider<sup>2</sup>

<sup>1</sup>) Wageningen University, Aquaculture and Fisheries

<sup>2</sup>) Wageningen IMARES

Rapport C019.09

Institute for Marine Resources and Ecosystem Studies

Wageningen **IMARES**

Vestiging IJmuiden & Yerseke

Opdrachtgever: Ministerie van LNV  
Dienst Regelingen Backoffice West  
Postbus 19530  
2500 CM Den Haag

Publicatiedatum: Maart 2009

Rapport nummer: C019/09

Page 1 of 84

- Wageningen **IMARES** levert kennis die nodig is voor het duurzaam beschermen, oogsten en ruimte gebruik van zee- en zilte kustgebieden (Marine Living Resource Management).
- Wageningen **IMARES** is daarin de kennispartner voor overheden, bedrijfsleven en maatschappelijke organisaties voor wie marine living resources van belang zijn.
- Wageningen **IMARES** doet daarvoor strategisch en toegepast ecologisch onderzoek in perspectief van ecologische en economische ontwikkelingen.

© 2009 Wageningen **IMARES**

Wageningen IMARES is geregistreerd in  
het Handelsregister Amsterdam  
nr. 34135929,  
BTW nr. NL 811383696B04.

De Directie van Wageningen IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Wageningen IMARES; opdrachtgever vrijwaart Wageningen IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

# Inhoudsopgave

Inhoudsopgave .....	3
1. Algemene inleiding .....	9
1.1 Achtergrond .....	9
1.2 Onderzoeksvraag .....	9
1.3 Opzet van het onderzoek .....	10
1.4 Uitvoering van het onderzoek .....	11
2. Karakterisering van groeiremming in tilapia .....	12
2.1 Doelstellingen .....	12
2.3 Materiaal and Methoden .....	12
2.3 Resultaten .....	14
2.5 Conclusie .....	23
3. De accumulatie van stoffen in Recirculatie Aquacultuur Systemen (RAS) hebben effect op embryonale en larvale ontwikkeling bij gewone karper ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	24
3.1 Doelstellingen .....	24
3.2 Materiaal en Methoden .....	24
3.3 Resultaten .....	24
3.4 Discussie .....	25
3.5 Conclusies .....	26
4. Groeivertraging bij vis – Is die soortspecifiek? .....	28
4.1 Doelen .....	28
4.2 Materiaal en methoden .....	28
4.3 Resultaten .....	28
4.4 Discussie .....	29
4.5 Conclusies .....	29
5. Effect van sorteren op groeivertraging bij Nijl Tilapia .....	31
5.1 Doelstellingen .....	31
5.2 Materiaal en Methoden .....	31
5.3 Resultaten .....	31

5.4 Discussie .....	32
5.5 Conclusies.....	32
6. Het effect van recirculatie van kweekwater op productie, fysiologie en gedrag van tarbot...	33
6.1 Inleiding	33
6.2 Materialen en methoden .....	33
6.3 Resultaten .....	40
6.4 Discussie .....	52
6.5 Conclusies.....	55
7. Het effect van recirculatie van kweekwater op groei en fysiologie van tong ( <i>Solea solea</i> )....	56
7.1 Inleiding	56
7.2 Materialen en Methoden.....	56
7.3 Resultaten .....	60
7.4 Discussie .....	64
7.5 Conclusies.....	66
8. Het effect van sorteren op voeropname en gedrag van tarbot .....	67
8.1 Inleiding	67
8.2 Materialen en methoden .....	67
8.3 Resultaten .....	70
8.4 Discussie .....	72
8.5 Conclusies.....	73
9 Workshop duurzame recirculatieteelt.....	74
9.1 Inleiding .....	74
9.2 Programma en opzet.....	74
9.3 Resultaten .....	75
9.4 Conclusies.....	77
10 Wetenschappelijke productie van het project.....	79
10.1 Aquaculture and Fisheries Group .....	79
10.2 Wageningen IMARES .....	80
Referenties.....	82
Verantwoording .....	84

# Samenvatting en conclusies

In Nederland wordt vis vooral in recirculatiesystemen (RAS) gekweekt, hetgeen als één van de meest duurzame manieren van viskweek wordt beschouwd. Of deze systemen echter optimaal zijn voor het welzijn en de gezondheid van de vis is nog de vraag. Een verminderde groei (GR "growth retardation") in recirculatiesystemen ten opzichte van doorstroomsystemen wordt gemeld voor zeebaars in de literatuur en voor een aantal andere soorten vanuit de praktijk. Dit geeft aan dat de kweekomstandigheden in RAS niet altijd optimaal zijn. Het belangrijkste verschil tussen recirculatiesystemen en doorstroomsystemen is de mate waarin het kweekwater wordt vervangen door vers water. Als gevolg van hergebruik van kweekwater treedt accumulatie op van opgeloste en gesuspendeerde stoffen die in het kweekstelsel geïntroduceerd zijn of geproduceerd worden. De mate waarin accumulatie optreedt wordt bepaald door de mate van verversing van het kweekwater. De onderzoeksvragen waren daarom: wat is het effect van de mate van recirculatie van kweekwater op (1) het gedrag van vis, (2) de fysiologie van vis en (3) de groei van vis; (4) is groeiremming in RAS soortspecifiek en welk inzicht in groeiremming levert dit op en (5) wat is het effect van sorteren van vissen op niet gesorteerde vissen binnen hetzelfde RAS?

Voor tilapia, tarbot en tong zijn afzonderlijk experimenten uitgevoerd met als doel het karakteriseren van groeiremming in RAS. Om inzicht te krijgen in de achterliggende oorzaken van groeiremming is niet alleen naar de productieparameters groei en voeropname gekeken, maar ook naar fysiologische- en gedragsparameters in relatie tot de mate van waterverversing van RAS. De waterverversing van de experimentele RAS werd ingesteld overeenkomstig de commerciële praktijk van de kweek van beide soorten en verschilde als gevolg daarvan tussen tarbot en tilapia.

Door paling en Afrikaanse meerval samen met tilapia in een tilapia RAS te huisvesten is onderzocht of de oorzaken voor groeiremming in RAS soortspecifiek zijn. Paling en Afrikaanse meerval vertoonden geen groeiremming terwijl dit wel voor de tilapia gevonden werd. Dit toont aan dat de oorzaken voor de groeiremming specifiek zijn voor tilapia.

Voor tilapia en tarbot zijn afzonderlijke experimenten uitgevoerd om een effect van het sorteren van vissen in een RAS op niet gesorteerde vissen in hetzelfde systeem te kunnen onderzoeken. De achtergrond hiervan is dat in een RAS vissen weliswaar fysiek van elkaar gescheiden zijn door huisvesting in verschillende tanks, deze vissen via het kweekwater toch met elkaar in contact staan.

Het vergelijken van de resultaten voor de verschillende vissoorten zou inzicht moeten geven in de algemene effecten van het recirculeren van kweekwater op vissen. Een dergelijke vergelijking is echter niet goed te maken. In alle experimenten is namelijk gekozen voor systeemverversingen die overeenkomen met de praktijksituatie, waardoor de mate van verversing van de experimentele recirculatiesystemen verschilde voor tilapia, tarbot en tong. Het gevolg van deze keuze is dat niet is vast te stellen of verschillen in resultaten tussen vissoorten inderdaad een effect zijn van de vissoort of een effect zijn van de mate van verversing van het recirculatiesysteem.

De resultaten worden hieronder per onderzoeksvraag weergegeven. De algemene conclusie van het onderzoek is dat voor geen van de onderzochte vissoorten het recirculeren van kweekwater grote effecten heeft op groei, fysiologie, gezondheid en gedrag die rechtstreeks gerelateerd zijn aan de accumulatie van stoffen in het kweekwater. Voor viskwekers betekent dit dat het gebruik van een recirculatiesysteem geen beperkende factor hoeft te zijn voor de kweek van gezonde vissen met een goede groei.

## **(1) Wat is het effect van recirculatie van kweekwater op het gedrag van vis?**

Tilapia Het recirculatiepercentage, dus de mate van verversing van het recirculatiewater, heeft geen effect op de tijd die elke vis spendeert aan eten. De latentietijd, de tijd die elke vis nam om de eerste voerpellet te consumeren, werd wel beïnvloed door de behandeling. Vissen die werden gekweekt in het MATIGE accumulatie RAS (70 l/kg voer) waren significant beter gemotiveerd te eten wanneer ze werden vergeleken met het HOGE (30 l/kg voer) en LAGE (1500 l/kg voer /dag) accumulatie RAS. Individueel gehuisveste vissen in de gewichtscategorie KLEINE vissen in het MATIGE accumulatie RAS lijken sterk te hebben bijgedragen

aan dit verschil, aangezien zij significant beter gemotiveerd waren te eten wanneer ze werden vergeleken met dezelfde gewichtscategorie in het HOGE en LAGE accumulatie RAS.

Tarbot Voerinnamedrag van grote tarbot werd niet beïnvloed door de mate van verversing van het kweekwater. Kleine tarbotten reageerden sneller op het aanbieden van voer in het doorstroomsysteem dan in beide recirculatiesystemen. De betekenis hiervan is niet duidelijk en ook niet of de hogere voerinnamedrag hier mee te maken heeft.

Zwemgedrag van de kleine tarbotten werd niet beïnvloed door het systeem. De grote tarbotten waren minder actief/vertoonden minder zwemactiviteit in het meest gesloten RAS t.o.v. de beide andere systemen. De betekenis hiervan is niet duidelijk.

## **(2) Wat is het effect van recirculatie van kweekwater op de fysiologie van vis?**

Tilapia De KLEINE snel groeiende vissen in het HOGE accumulatie RAS hebben een hoger glucosegehalte in het bloedplasma (en ook een hoger cortisolniveau, hoewel niet significant verschillend) in vergelijking met KLEINE langzamer groeiende vissen uit het LAGE accumulatie RAS. Hoewel hoge glucose- (en cortisol-) plasmaniveaus vaak als indicatie worden gebruikt voor stress en verminderde groei, schijnt het in dit onderzoek niet het geval te zijn. Een dergelijke relatie tussen snelle groei en hoge stressresponse is recent aangetoond voor zeebaars (Tort et al., 2001).

Tarbot. Het in dit experiment gemeten hematocriet ligt voor alle kweeksystemen binnen de normale bandbreedte voor tarbot. Tijdens de eerste bemonstering werd geen effect van kweekstelsel op hematocriet waargenomen. Tijdens de tweede bemonstering werd een hoger hematocriet waargenomen in het meest gesloten recirculatiesysteem. De verschillen zijn echter klein en moeilijk te verklaren. Verschillen in zuurstofconcentratie zijn geen verklaring.

Op de eerste monsterdag werden verschillen tussen kweeksystemen gevonden in de glucosegehalten in het bloedplasma. Het glucosegehalte was lager in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) dan in de twee andere kweeksystemen, die onderling niet verschilden. Op de tweede monsterdag werden echter geen verschillen tussen kweeksystemen gevonden. De in dit experiment waargenomen glucosegehalten lopen uiteen van circa 1.6 tot 2.4 mmol/L en liggen daarmee voor alle kweeksystemen op het niveau van niet gestresste tarbot (Van Ham et al., 2003). De lagere glucosegehalten in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%), waargenomen op de eerste monsterdag, houden mogelijk verband met de lagere zwemactiviteit die in dezelfde periode werd waargenomen in dit kweekstelsel voor met name de grote vissen.

Voor alle drie de kweeksystemen geldt echter dat de miltindex (0.10 tot 0.17%) veel hoger is dan de 0.05% die is gesuggereerd als een representatieve waarde voor gekweekte tarbot (Quentel en Obach, 1992). Het is dus mogelijk dat het immuunsysteem van de tarbot in dit experiment verhoogde activiteit vertoonde, relatief onafhankelijk van het kweekstelsel. Het volledig ontbreken van meetbare leucocrietwaarden in alle kweeksystemen en op beide monsterdagen duidt er echter op dat ten tijde van de bemonstering geen sprake was van chronische danwel acute ontstekingen in de bemonsterde tarbot.

Zeker is dat het recirculeren van het kweekwater niet leidde tot grote verschillen in cortisolgehalten tussen kweeksystemen. Bovendien is met zekerheid aangetoond dat geen van de kweeksystemen leidde tot acute stress, aangezien acute stress bij tarbot resulteert in cortisolgehalten in het bloedplasma van 50 tot 80 ng/ml, afhankelijk van saliniteit en watertemperatuur (Van Ham et al., 2003), terwijl in dit experiment geen hogere gemiddelde cortisolgehalten dan 15.5 ng/ml gevonden werden.

Op basis van deze waarnemingen wordt geconcludeerd dat het recirculeren van het kweekwater niet lijkt te leiden tot een verhoogde activiteit van het immuunsysteem, niet leidt tot grote fysiologische veranderingen in tarbot en niet leidt tot stress bij tarbot.

Tong De concentratie van cortisol in het bloedplasma van tong werd beïnvloed door de experimentele behandelingen. In RAS was het plasma cortisolgehalte significant hoger dan in BRON en MIX, die onderling niet verschilden. De parasitaire infectie in RAS verklaart mogelijk dit verschil.

De glucosegehalten in het bloedplasma waren gelijk en opvallend laag in alle drie de behandelingen. De verhoogde cortisol leidde niet tot verhoging van glucose.

In dit experiment werden geen verschillen in miltindex waargenomen tussen de drie experimentele behandelingen. Leucocrietgehalten verschilden ook niet tussen behandelingen en waren zeer laag, waardoor slechts de aan- of afwezigheid van leucocriet kon worden vastgesteld.

De resultaten van dit experiment duiden er daarom op dat ten tijde van de bemonstering geen sprake was van chronische dan wel acute ontstekingen in de bemonsterde tong.

Hematocrietgehalten lagen rond de 6% en waren niet verschillend tussen behandelingen. Het ontbreekt aan gepubliceerde hematocrietgehalten voor tong waarmee de huidige resultaten vergeleken kunnen worden.

De resultaten van dit experiment tonen aan dat het recirculeren van kweekwater gevolgen kan hebben voor de groei en gezondheid van de gekweekte tong. Het recirculeren van het kweekwater leidde in dit experiment bij tong tot een lagere groei als gevolg van een slechtere voerbenutting en waarschijnlijk tot chronische stress. Dit systeemeffect op zowel groei als stress wordt mogelijk mede veroorzaakt door de in dit experiment hogere infectiedruk van huidparasieten in het recirculatiesysteem. De resultaten suggereren daarmee dat er een nauwe relatie bestaat tussen enerzijds de groei en gezondheid van kweekvis in recirculatiesystemen en anderzijds de samenstelling van microbiologische populaties in het recirculatiesysteem. De vraag of in afwezigheid van huidparasieten het recirculeren van kweekwater een effect heeft op de groei en gezondheid van tong kan niet beantwoord worden.

### **(3) Wat is het effect van recirculatie van kweekwater op de groei van vis?**

Tilapia. GROTE individueel gehuisveste vissen vertoonden de tendens beter te groeien in the LAGE accumulatie behandeling ( $2.66 \pm 1.35 \text{ g/kg}^{0.8}/\text{dag}$ ) in vergelijking tot de MATIGE accumulatie behandeling ( $0.93 \pm 1.63 \text{ g/kg}^{0.8}/\text{dag}$ ). Dit suggereert dat GROTE individuen gevoeliger zijn voor GIF (groeiremming veroorzakende factoren).

Daar staat tegenover dat KLEINE individueel gehuisveste vissen een significant lagere groeisnelheid lieten zien in het LAGE accumulatie RAS ( $3.60 \pm 1.74 \text{ g/kg}^{0.8}/\text{dag}$ ) vergeleken met het HOGE ( $7.22 \pm 1.58 \text{ g/kg}^{0.8}/\text{dag}$ ) en MATIGE ( $6.82 \pm 4.54 \text{ g/kg}^{0.8}/\text{dag}$ ) accumulatie RAS. De belangrijkste verklarende hypothese voor de lage groeisnelheid in de KLEINE individueel gehuisveste vissen ten opzichte van dezelfde categorie in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS is: 1) kleine vissen kunnen voordeel hebben van de accumulatie van organisch materiaal (extra voedsel) dat accumuleert in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS en 2) verminderde gevoeligheid voor de accumulatie van GIF (groeiremmende factoren) in de HOGE en MATIGE accumulatie RAS als gevolg van een lagere pH in deze RAS.

Tarbot Een groot effect van de mate van verversing van het kweekwater in de recirculatiesystemen op de groei van tarbot kon in dit experiment niet worden aangetoond. Gezien de mogelijkheid dat een klein effect van kweekstelsel in dit experiment gemaskeerd werd door andere factoren, met name de wijze waarop de groei gemeten is, kan een klein effect van kweeksystemen op groei niet geheel worden uitgesloten. Zeker is echter wel dat als er een effect van kweekstelsel op groei van tarbot bestaat, dit effect klein is.

In dit experiment werd wel een effect van het kweekstelsel op de voerinname waargenomen. De voerinname in de beide recirculatiesystemen was lager dan in het doorstroomsysteem. In combinatie met de gelijke groei, leidde dit tot een betere voerbenutting (lagere voederconversie) in de recirculatiesystemen.

Tong. De specifieke groeisnelheid van de tong werd sterk beïnvloed door de experimentele behandelingen: BRON>MIX>RAS. De waargenomen groeiverschillen zijn het gevolg van verschillen in voerbenutting en worden niet veroorzaakt worden door verschillen in voerinname. De lagere groei van de tong in RAS ten opzichte van BRON zijn mogelijk het gevolg van de hogere infectiegraad van huidparasieten als gevolg van een lagere benutting van energie ten behoeve van groei.

### **(4) Is groeiremming in RAS soortspecifiek en welk inzicht in groeiremming levert dit op?**

Tilapia Afrikaanse meerval en Europese paling vertoonden geen groeiremming wanneer ze werden opgekweekt in een recirculatiesysteem waarin voornamelijk tilapia wordt gekweekt. Rekening houdend met de hogere gevoeligheid van paling voor waterkwaliteitsparameters in vergelijking met tilapia en Afrikaanse meerval zou men een effect verwachten op de groei van paling wanneer GIF systeemgerelateerd zou zijn.

Omdat dit niet het geval is wordt verondersteld dat GIF visgerelateerd zijn. Het type visgerelateerde GIF is echter onbekend. Verder onderzoek is nodig om meer inzicht in deze waarneming te verkrijgen.

#### **(5) Wat is het effect van sorteren van vissen op niet gesorteerde vissen binnen hetzelfde RAS?**

Deze onderzoeksvraag haakt in op het gegeven dat in een RAS vissen weliswaar fysiek van elkaar gescheiden kunnen zijn door huisvesting in verschillende tanks, maar dat het kweekwater wel alle tanks bereikt en daardoor alle vissen indirect met elkaar in contact brengt. Productie van groeiremmende stoffen in één deel van het systeem heeft daardoor mogelijk gevolgen voor alle vissen gehuisvest in het RAS.

Tilapia Individueel gehuisveste tilapia die water ontvingen van gestresste groepsgehuisveste tilapia veranderden hun voerinnamen en voerinnamen motivatie niet. Het ontbreken van een reactie bij individueel gehuisveste vissen kan veroorzaakt zijn door het feit dat het aan het water afgegeven cortisol van de gestresste vissen niet in voldoende mate via diffusie in het plasma van niet gestresste vissen terecht is gekomen. De hoeveelheid vrije cortisol in het water, cortisol beschikbaar voor diffusie vanuit het water naar het plasma, was waarschijnlijk niet voldoende om een reactie te induceren. Een mogelijke reden voor een reductie in vrije cortisol is waarschijnlijk de hoge concentratie aan humuszuren in de RAS. Zoals gesuggereerd door Hubbard et al. (2002) kunnen steroïden worden ingevangen op het oppervlak van humuszuren, waardoor ze niet beschikbaar zijn voor olfactorische detectie. Echter, het blijft de vraag of humuszuren hetzelfde invangende effect hebben op cortisol en daardoor transport van cortisol via passieve diffusie verminderen.

Tarbot Het samendrijven, uit de tank scheppen, wegen en terugplaatsen van grote tarbot had geen effect op de voerinnamen en voerinnamen gedrag van juveniele tarbot in hetzelfde recirculatiesysteem.

Deze vergelijkbare resultaten voor beide vissoorten zijn opvallend omdat vooraf, mede op basis van ervaringen uit de praktijk, verwacht werd dat sorteren een effect zou hebben. Deze resultaten tonen aan dat als er een effect is van sorteren op niet gesorteerde vissen binnen hetzelfde RAS, dit voor de onderzochte grootteklassen waarschijnlijk niet veroorzaakt wordt door signaalstoffen die zich via het water door het kweekstelsel verspreiden. Wanneer in de praktijk toch een effect op van niet gesorteerde vissen als gevolg van sorteren van andere vissen wordt waargenomen, heeft dit mogelijk te maken hebben met verstoring van de vissen door geluiden en trillingen die de sorteeractiviteiten met zich meebrengen. Nader onderzoek is nodig om dit vast te stellen.

#### **Wat is het effect van de mate van verversing van het kweekwater op de groei en gezondheid van de vis?**

De algemene conclusie ten aanzien van de centrale vraag van dit onderzoek: wat is het effect van de mate van verversing van het kweekwater op de groei en gezondheid van de vis is:

Tilapia Jonge Nijl Tilapia tot een gewicht van  $\pm 150$ g kunnen worden gekweekt in bijna gesloten recirculatiesystemen met een waterverversing van ongeveer 30 l per kg voer per dag zonder afname van voerinnamenmotivatie, voerinnamen, voederconversie en groei. Daar staat tegenover dat grote tilapia ( $\pm 300$ g) groeiremming kunnen vertonen in bijna gesloten systemen.

Tarbot Zowel jonge als volwassen tarbotten kunnen worden gekweekt in recirculatiesystemen met een systeemverversing van circa 600L/kg voer zonder dat dit leidt tot grote productieverliezen, fysiologische veranderingen en gedragsveranderingen.

Tong Voor tong is met vrij grote zekerheid aangetoond dat er een nauwe relatie bestaat tussen de microbiologische populaties in recirculatiesysteem enerzijds en groei, voerbenutting en chronische stress anderzijds.



# 1. Algemene inleiding

## 1.1 Achtergrond

In Nederland wordt vis vooral in recirculatiesystemen (RAS) gekweekt, dat als één van de meest duurzame manieren van viskweek wordt beschouwd. Dit komt vooral door zijn energie en water besparende eigenschappen en de beperkte uitstoot van mineralen naar de omgeving. Echter, of deze systemen optimaal zijn voor het welzijn en de gezondheid van de vis is nog de vraag. Veel soorten die in deze systemen gekweekt worden vertonen een verminderde groei (GR “growth retardation”) in vergelijking met doorstroom systemen. De reden hiervoor en het achterliggende mechanisme is niet bekend, maar het geeft wel aan dat de kweekomstandigheden in RAS niet altijd optimaal zijn. De onbekendheid van het achterliggende mechanisme maakt het moeilijk strategieën te ontwikkelen om het RAS op dit gebied te verbeteren. Hierdoor komt ook de economische haalbaarheid van RAS in geding.

Het belangrijkste verschil tussen recirculatiesystemen en open kweeksystemen is de mate waarin het kweekwater wordt vervangen door vers water. Als gevolg van hergebruik van kweekwater treedt accumulatie op van opgeloste en gesuspendeerde stoffen die in het kweekstelsel geïntroduceerd zijn of geproduceerd worden. Dit betreft componenten afkomstig uit het voer, metabolieten en signaalstoffen geproduceerd door de vissen en stoffen geproduceerd door micro-organismen. De mate waarin accumulatie optreedt wordt bepaald door de mate van vervanging van het kweekwater. In doorstroomsystemen met een zeer hoge mate van vervanging is accumulatie het laagst en in zogenaamde ‘zero-discharge’ systemen waaraan geen of nauwelijks verversingswater wordt toegevoegd, het hoogst.

Voor het handhaven van de waterkwaliteit in viskweeksystemen wordt met name op temperatuur, zuurstof, ammoniak, pH en in beperkte mate op CO<sub>2</sub> gestuurd. De effecten van deze parameters op de groei en gezondheid van vissen zijn vrij goed gedocumenteerd en direct merkbaar. Naast deze parameters zijn er meer stoffen die de kwaliteit van het water bepalen. Juist in recirculatiesystemen zullen allerlei stoffen accumuleren tot concentraties waarbij een effect op het welzijn, de gezondheid en groei van de vis optreedt. Dergelijke stoffen kunnen worden aangeduid als groeiremmende factoren (GIF, *growth inhibiting factors*). Omdat de aard en oorsprong van deze GIF tot op heden niet bekend zijn, kunnen geen maatregelen getroffen worden om de productie van GIF te voorkomen of GIF uit het kweekwater te verwijderen. Voor een goed management van recirculatiesystemen en om recirculatie systemen concurrerend te kunnen laten zijn met doorstroomsystemen, is het daarom noodzakelijk onze kennis uit te breiden naar andere waterkwaliteitsparameters.

Voordat een oplossing voor het probleem van groeiremming gevonden kan worden moet fundamentele kennis ontwikkeld worden. De vraag of GIF door vissen worden geproduceerd, of/en door bacteriën in de biofilter zal eerst moeten worden opgelost. Ook informatie over de karakterisering van groeiremming in de relevante vissoorten, en leeftijd of soort specificiteit moet worden verzameld. Daarom is het belangrijkste doel van dit onderzoek inzicht te geven in de mechanismen die verantwoordelijk zijn voor groeiremming. Groeivermindering is een belangrijk en goed zichtbaar probleem in RAS. Vooral in zoutwatersystemen treedt groeivermindering vaak op. Dit betekent niet dat als groei wel optimaal is er geen probleem zou zijn. Het is mogelijk dat er wel degelijk problemen met welzijn of gezondheid van de vissen is zonder dat dit direct resulteert in groeivermindering.

Hoewel groeivermindering in zoetwatersystemen niet vaak optreedt, is er een trend om deze systemen meer en meer volledig gesloten te maken waardoor de accumulatie van stoffen toeneemt. Dit heeft mogelijk effecten op groei, welzijn en gezondheid van de vissen.

Een groeivermindering ontstaat als gevolg van verminderde voeropname en/of een verminderde voerbenutting. Bij de groeiremming die optreedt in RAS is de invloed van deze twee aspecten vooralsnog onbekend. Daarnaast zijn er zowel verschillende gedrags-, gezondheids- als endocriene mechanismen die ten grondslag liggen aan de veranderingen van voeropname en voerbenutting. Deze mechanismen zijn in de context van groeiremming in RAS nooit onderzocht.

## 1.2 Onderzoeksvraag

De oorspronkelijke kennisvraag die aan dit project ten grondslag ligt, luidt:

Via welke fysisch-chemische en biologische processen beïnvloeden factoren als het management, de waterkwaliteit, signaalstoffen en metabolieten de groei en de gezondheid van de vis in het recirculatiesysteem?

Analyse van deze kennisvraag leidt tot één basale onderzoeksvraag: wat is het effect van de mate van verversing van het kweekwater op de groei en gezondheid van de vis. De mate van verversing van het water in een recirculatiesysteem was daarom een steeds terugkerende behandeling in al het onderzoek.

De basale onderzoeksvraag is vervolgens uitgesplitst in drie onderliggende onderzoeksvragen:

- 1) Wat is het effect van recirculatie van kweekwater op gedrag, fysiologie en groei van vis? Beantwoording van de eerste onderzoeksvraag leidt tot een karakterisering van groeiremming.
- 2) Is groeiremming soortspecifiek? Deze vraag is van belang vanwege het groeiende aantal vissoorten dat in Nederland gekweekt wordt. Daarnaast geeft het inzicht in de oorsprong van groeiremmende stoffen.
- 3) Wat is het effect van sorteren van vissen op niet gesorteerde vissen binnen hetzelfde RAS? Deze onderzoeksvraag haakt in op het geven dat in een RAS vissen weliswaar fysiek van elkaar gescheiden kunnen zijn door huisvesting in verschillende tanks, het kweekwater wel alle tanks bereikt en daardoor alle vissen indirect met elkaar in contact brengt. Productie van groeiremmende stoffen in een deel van het systeem heeft daardoor mogelijk gevolgen voor alle vissen in het RAS.

Deze drie onderzoeksvragen vormden de uitgangspunten voor de opzet van experimenteel onderzoek.

### 1.3 Opzet van het onderzoek

Gezien de fysiologische verschillen en de grote verschillen in de natuurlijke leefmilieus tussen zoet en zoutwater vissoorten is het aannemelijk dat de interactie van beide groepen vissen met het kweekstelsel op andere wijze of in andere mate plaatsvindt. Daarnaast kunnen verschillen in interactie tussen vis en stelsel voor zoetwater en zoutwater vissoorten bijdragen aan het algemene inzicht in de mechanismen die aan de waargenomen verschijnselen ten grondslag liggen. Het onderzoek is daarom voor beide categorieën uitgevoerd. Als vertegenwoordigers van de Nederlandse kweek in zout- en zoetwater is gekozen voor tarbot (*Scophthalmus maximus*) en Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Deze beide soorten zijn nu al belangrijk in de aquacultuur in RAS in Nederland en we verwachten een verdere toename van de kweek van deze soorten.

De experimentele opzet is op hoofdlijnen gelijk voor tarbot en tilapia. Voor beide soorten is gebruik gemaakt van kweeksystemen overeenkomstig praktijkcondities waarin groeiremming voorkomt. Het effluent van deze productiesystemen is gebruikt om experimentele eenheden te doorstromen. Een dergelijk opzet maakt het mogelijk om enerzijds een commerciële praktijksituatie na te bootsen, inclusief groeiremming, en de gevolgen van recirculatie van het kweekwater op gestandaardiseerde wijze te testen op vissen zonder de productie van groeiremmende factoren in de productiesystemen te verstoren.

Het onderzoeksprogramma is opgebouwd uit een serie opeenvolgende experimenten die aansluiten op de onderzoeksvragen.

Experiment 1 richt zich op het begrijpen van de mechanismen achter groeiremming, en concentreert zich op de effecten van GIF op voeropname/benutting en hoe gedrags-, endocriene en immunologische mechanismen deze twee groei componenten beïnvloeden.

Experiment 2 richt zich op het wel of niet soortspecifiek zijn van de GIF aanwezig in de productiesystemen voor tilapia en tarbot. Voor tilapia is onderzocht of andere vissoorten groeiremming vertonen als gevolg van huisvesting in een kweekstelsel met tilapia. Voor zoutwater RAS is onderzocht of het effect van recirculatie op een andere vissoort (tong) overeenkomt met het effect op tarbot. De wetenschap of groeiremming in recirculatiesystemen wel of niet soortspecifiek is, is van groot belang voor de Nederlandse visteeltsector die een groeiend aantal vissoorten produceert. Wanneer blijkt dat groeiremming niet soortspecifiek is, is dat een belangrijk gegeven voor andere gekweekte vissoorten. Daarnaast geeft het inzicht in de mogelijke bron van groeiremmende factoren, hetzij de vis, hetzij de microbiologische biomassa in het stelsel.

Experiment 3 richt zich op het effect van stress als gevolg van het verrichten van handelingen met een groep vissen (zoals sorteren) op andere vissen binnen hetzelfde recirculatiesysteem. Van sorteren is bekend

dat het een acute stressor is voor de gesorteerde vis. In recirculatiesystemen heeft sorteren of andere behandeling van vis mogelijk belangrijke consequenties voor andere vissen in hetzelfde systeem die weliswaar niet behandeld worden maar wel in hetzelfde kweekwater zitten. Signaalstoffen die worden afgescheiden door de gesorteerde vissen kunnen via het kweekwater andere vissen in het systeem bereiken en mogelijk beïnvloeden. Begrip van het effect van sorteren van vis op andere, niet gesorteerde, vis in hetzelfde kweekstelsel levert daarom inzicht op in de oorsprong van groeiremmende factoren in recirculatiesystemen. Wanneer gesorteerde vissen andere vissen blijken te beïnvloeden, is het waarschijnlijk dat groeiremmende factoren in recirculatiesystemen afkomstig zijn van de vissen in het systeem. Tevens kunnen aan de hand van de resultaten concrete aanbevelingen worden gedaan aan viskwekers ten aanzien van het behandelen van vissen binnen een recirculatiesysteem.

#### 1.4 Uitvoering van het onderzoek

Het onderzoek is uitgevoerd door de leerstoelgroep Aquacultuur en Visserij van Wageningen Universiteit en de afdeling Aquacultuur van Wageningen IMARES in de periode september 2006 tot oktober 2008.

## 2. Karakterisering van groeiremming in tilapia

Catarina Martins en Ep Eding  
Leerstoelgroep Aquacultuur en Visserij, Wageningen Universiteit.

### 2.1 Doelstellingen

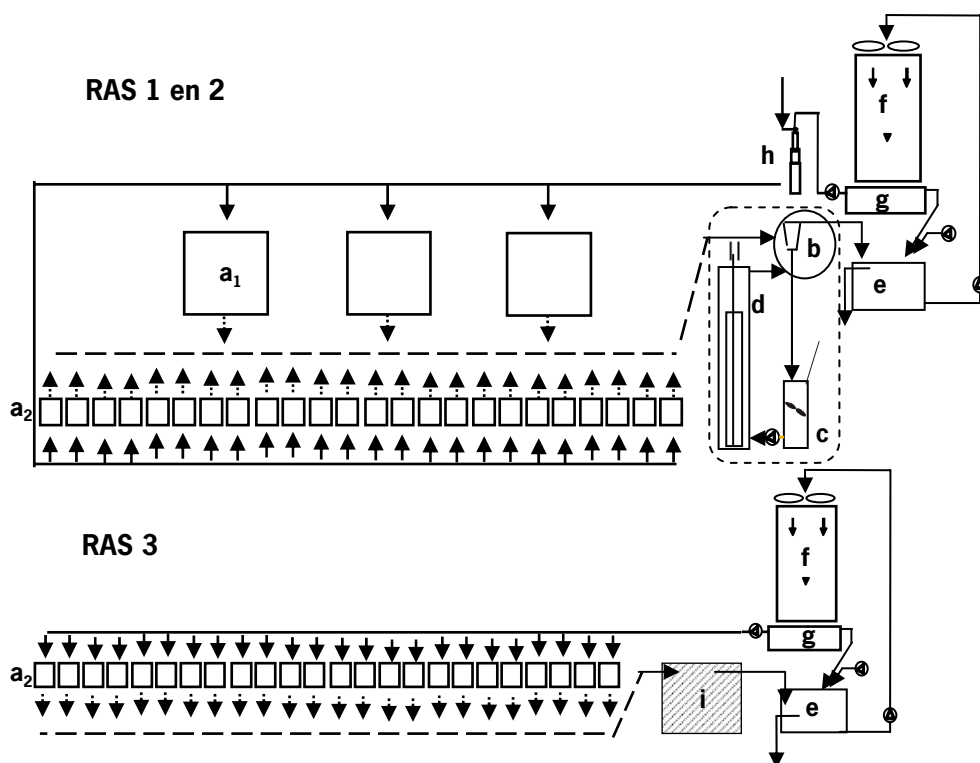
De hoofddoelstellingen van dit experiment zijn: 1) bepalen of groeivertraging voorkomt bij tilapia's gekweekt in RAS; 2) groeivertraging karakteriseren door a) te bepalen of vissen van verschillende leeftijd (gewicht) verschillen in gevoeligheid voor groeivertraging b) vast te stellen welke veranderingen in gedrag en stressrespons optreden voor er veranderingen in groei waargenomen geobserveerd worden.

### 2.3 Materiaal and Methoden

Er werden drie RAS gebruikt (Figuur 2.1). RAS 1 and 2 hadden alle potentiële bronnen van GIF: vis, biofilter en/of voedsel, door respectievelijk gebruik te maken van een hoge visdichtheid, een 'oud' biofilter en een hoge voederbelasting. Deze twee systemen verschilden slechts in waterverversingssnelheid, zodat er een verschillende concentratie GIF gesimuleerd kon worden. RAS 3 functioneerde als controlesysteem door alle potentiële bronnen van GIF te beperken tot een minimum: er werden een lage bezettingsdichtheid, een 'jong' biofilter, een lage voederbelasting en een hoge waterverversingssnelheid gebruikt (Tabel 2.1). RAS 1 and 2 bevatten kweek- en experimentele tanks. Het ingaande water van de kweektanks was verbonden met het ingaande water van 24 experimentele tanks (met individueel 'gehuiste' vissen) waarin alle metingen gedaan werden. Eerdere studies wezen uit dat isolatie geen stressfactor is bij Nijl Tilapia en dus bij deze soort gebruikt kan worden als manier om de ontwikkeling van sterke sociale hiërarchieën te voorkomen. In elke RAS werden, zowel in de kweek- als in de experimentele tanks, drie verschillende leeftijdsklassen (gewichtsklassen) gebruikt:  $\pm 50$  g,  $\pm 200$  g en  $\pm 400$  g. Een voorperiode van 8 weken werd gebruikt om in elk RAS een stabiele toestand te bereiken, gevolgd door een experimentele periode van 8 weken. Kweekvissen werden uitsluitend gevoerd door gebruik te maken van voerautomaten, terwijl de experimentele vissen tweemaal per dag *ad libitum* met de hand gevoerd werden. Zowel kweek- als experimentele vissen werden met hetzelfde commerciële voer (drijvende pellets, 3mm, 44% eiwit, Skretting, Frankrijk) gevoerd. De vissen werden alleen aan het begin en aan het eind van het experiment gewogen. Ook de dagelijkse voedselinname werd bepaald. Dit maakte berekening van prestatieparameters zoals groeisnelheid, voedselinname en voederconversie mogelijk aan het eind van het experiment. Tijdens het experiment werd dagelijks de waterkwaliteit (temperatuur, zuurstof, pH, geleidbaarheid,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}_3^-$ ) bepaald. Gedragsobservaties werden eens per week gedaan door middel van directe observatie (latentie voor voeding, d.w.z.: de tijd die elke vis nam om de eerste voerpellet te consumeren, en de totale voertijd, d.w.z.: de totale tijd die elke vis spendeert aan eten). Bloedmonsters voor cortisol en glucose werden 15 dagen voor het eind van het experiment genomen, als meting voor eventuele chronische stress, en aan het eind van het experiment nadat er een acute stressfactor toegediend was (als meting van acute stress toegediend na een chronische stress). De acute stress werd toegediend door elke vis 60 seconden in een net buiten het water te houden. Bloedmonsters werden 2 uur na het toedienen van de acute stress genomen. Aan het einde van het experiment werden de leucocrit- en haematocritwaarden bepaald evenals het gewicht van de lever en de milt.

Tabel 2.1. Experimentele verschillen tussen RAS 1, 2 en 3

	RAS1: HOGE GIF accumulatie	RAS 2: MATIGE GIF accumulatie	RAS 3: LAGE GIF accumulatie
<i>Kweektanks</i>	3 tanks, elk 450 L	3 tanks, elk 450 L	Geen
Bezettingsdichtheid	Hoog	Hoog	Laag (individueel)
Voerbelasting	Hoog	Hoog	Laag
Vis -Vis contact	Hoog	Hoog	Geen
Biofilter leeftijd	> 5 jaar	> 5 jaar	1 maand
Waternieuwmaking	Laag (30L/kg voer)	Hoog (70 L/kg voer)	Hoog (1500 L/kg voer)
<i>Experimentele tanks</i>	24 tanks, elk 40 L	24 tanks, elk 40 L	24 tanks, elk 40 L



Figuur 2.1. Schema van RAS 1, 2 en 3 zoals gebruikt in dit experiment. In RAS 1 en 2 stroomt water als volgt: de kweektanks ( $a_1$ ) /experimentele tanks ( $a_2$ ) – drum filter ( $b$ ) – buffer tank ( $c$ ) – denitrificatie reactor ( $d$ ) – drum filter ( $b$ ) – reservoir 1 ( $e$ ) – trickling filter ( $f$ ) – reservoir 2 ( $g$ ) – zuurstofreactor ( $h$ ) – kweektanks/experimentele tanks ( $a_1$ ). In RAS 3 stroomt water als volgt: experimentele tanks ( $a_1$ ) – plaatbezinker ( $i$ ) – reservoir 1 ( $e$ ) – trickling filter ( $f$ ) – reservoir 2 ( $g$ ) – experimentele tanks ( $a_1$ ).

## 2.3 Resultaten

### *Waterkwaliteit*

De waterkwaliteit van de drie recirculatiesystemen is samengevat in Tabel 2.2. In het algemeen verschilden het LAGE accumulatie RAS in de meeste waterkwaliteitsparameters met zowel het HOGE als het MATIGE accumulatie RAS. Het LAGE accumulatie RAS had de laagste waarden voor geleidbaarheid, opgelost CO<sub>2</sub>, CZV, TAN NO<sub>3</sub>-N en orthofosfaat-P en de hoogste waarden voor pH en opgeloste zuurstof. Het HOGE en MATIGE accumulatie RAS waren qua waterkwaliteit vergelijkbaar, met uitzondering van de pH, geleidbaarheid en CZV, die waren namelijk hoger in het HOGE accumulatie RAS. De alkaliniteit in het LAGE accumulatie RAS verschilden statistisch alleen van het MATIGE accumulatie RAS, in het LAGE accumulatie RAS was de alkaliniteit het hoogst. NO<sub>2</sub>-N was in alle RAS gelijk.

Figuur 2.2 toont de veranderingen in waterkwaliteit over de 57 dagen durende groeiperiode. De temperatuur en hoeveelheid opgeloste zuurstof blijven constant gedurende de groeiperiode, de pH nam in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS geleidelijk af terwijl het toenam in het LAGE accumulatie RAS. De geleidbaarheid bleef constant voor het LAGE en MATIGE accumulatie RAS, maar steeg langzaam in het HOGE accumulatie RAS (Figuur 2.2, C). Orthofosfaat, CZV, opgelost CO<sub>2</sub>, TAN en NO<sub>3</sub>-N schenen zich gedurende de periode op te hopen in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS. De alkaliniteit nam gedurende de periode toe in de LAGE accumulatie behandeling, in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS gebeurde echter het tegenovergestelde, daar nam de alkaliniteit af. De denitrificatiereactor leverde sterk gelijkende prestaties in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS, met een uitzondering voor de alkaliniteit die hoger was in het HOGE accumulatie RAS.

Tabel 2.2. Samenvatting van de waterkwaliteitsparameters in de RAS die verschillen in de hoeveelheid GIF-accumulatie (gemiddelden ( $\pm$  SD) per waterkwaliteitsparameter in de vistank effluent monsters verzameld tijdens de 57 dagen durende experimentele periode).

Parameters	HOGE accumulatie	MATIGE accumulatie	LAGE accumulatie	<i>P</i> -waarde
<b>Vistanks (effluent)</b>				
Temperatuur (°C)	27.68 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	27.86 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	27.66 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	<0.001
pH	6.91-7.89 <sup>a</sup>	6.34-7.83 <sup>b</sup>	7.98-8.8 <sup>c</sup>	<0.001
	1404.88 $\pm$ 83.82 <sup>a</sup>	1142.63 $\pm$ 22.96 <sup>b</sup>	744.21 $\pm$ 12.51 <sup>c</sup>	<0.001
Geleidbaarheid ( $\mu$ S/cm)			130.75 $\pm$ 44.61	0.01
Alkaliniteit (mg/l as CaCO <sub>3</sub> )	72.4 $\pm$ 31.12 <sup>ab</sup>	46.15 $\pm$ 34.80 <sup>a</sup>		
Opgelost O <sub>2</sub> (mg/l)	6.41 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	6.44 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	7.49 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	<0.001
Opgelost CO <sub>2</sub> (mg/l)	2.50 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	2.60 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	<0.001
Chemisch Zuurstof Verbruik(mg/l)	144.03 $\pm$ 30.90 <sup>a</sup>	95.39 $\pm$ 13.66 <sup>b</sup>	7.78 $\pm$ 3.24 <sup>c</sup>	<0.001
TAN (mg/l)	0.36 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.32 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	<0.001
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	0.29 $\pm$ 0.35	0.29 $\pm$ 0.32	0.30 $\pm$ 0.39	ns
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	56.95 $\pm$ 8.75 <sup>a</sup>	63.02 $\pm$ 4.59 <sup>a</sup>	30.86 $\pm$ 3.71 <sup>b</sup>	<0.001
Orthofosfaat-P (mg/l)	16.96 $\pm$ 4.20 <sup>a</sup>	16.86 $\pm$ 2.28 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	<0.001
<b>Denitrificatie reactor (effluent)</b>				
Alkaliniteit (mg/l as CaCO <sub>3</sub> )	275.55 $\pm$ 26.01	229.45 $\pm$ 15.87	-	0.01
TAN (mg/l)	0.88 $\pm$ 0.99	0.56 $\pm$ 0.57	-	ns
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	2.30 $\pm$ 1.79	3.36 $\pm$ 2.62	-	ns
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	13.40 $\pm$ 14.38	42.24 $\pm$ 49.93	-	ns
Orthofosfaat-P (mg/l)	17.73 $\pm$ 5.44	18.35 $\pm$ 3.12	-	ns

### *Voerinnname, groei en voederconversie*

Tabel 2.3 vat het effect van RAS, grootte en hun interactie op alle vis-gerelateerde parameters samen. Voerinnname, groei en voederconversie waren sterk gelijkend in alle RAS, onafhankelijk van de gewichtscategorie ( $P > 0.05$ ). Zoals verwacht had de gewichtscategorie een significant effect op alle

groeiprestatieparameters, waarbij de kleinere individuen een hogere relatieve voerinnname en hogere groeiselheden vertoonden ( $P < 0.001$ ). De manier waarop de vissen in de verschillende RAS groeiden is afhankelijk van de gewichtscategorie, zoals aangetoond door de significante interactie tussen RAS en gewichtscategorie ( $P = 0.026$ ). In Figuur 2.4 wordt de groeiselheid vergeleken tussen de 3 RAS voor de verschillende gewichtscategorieën. Grote individuen vertoonden een trend ( $P = 0.096$ ) richting een toegenomen groeiselheid in het LAGE accumulatie RAS vergeleken met het MATIGE accumulatie RAS. Daarentegen vertoonden kleine individuen juist een trend om langzamer te groeien in het LAGE accumulatie RAS vergeleken met het MATIGE ( $P = 0.097$ ) en HOGE ( $P = 0.057$ ) accumulatie RAS. Middelgrote individuen groeiden even snel, onafhankelijk van de mate van GIF-accumulatie in het RAS.

#### *Visgedrag*

Vissen gekweekt in het MATIGE accumulatie RAS waren significant meer gemotiveerd om te eten (lagere latentiewaarden) vergeleken met de andere 2 RAS (Tabel 2.3). Kleine individuen schenen, zoals getoond in Figuur 2.4, sterk bijgedragen te hebben aan dit verschil. Bij het vergelijken van de latentie tussen de RAS binnen elke gewichtscategorie bleek dat de kleine individuen significant sterker gemotiveerd waren om te eten in het MATIGE accumulatie RAS in vergelijking met het HOGE ( $P = 0.04$ ) en LAGE ( $P = 0.001$ ) accumulatie RAS.

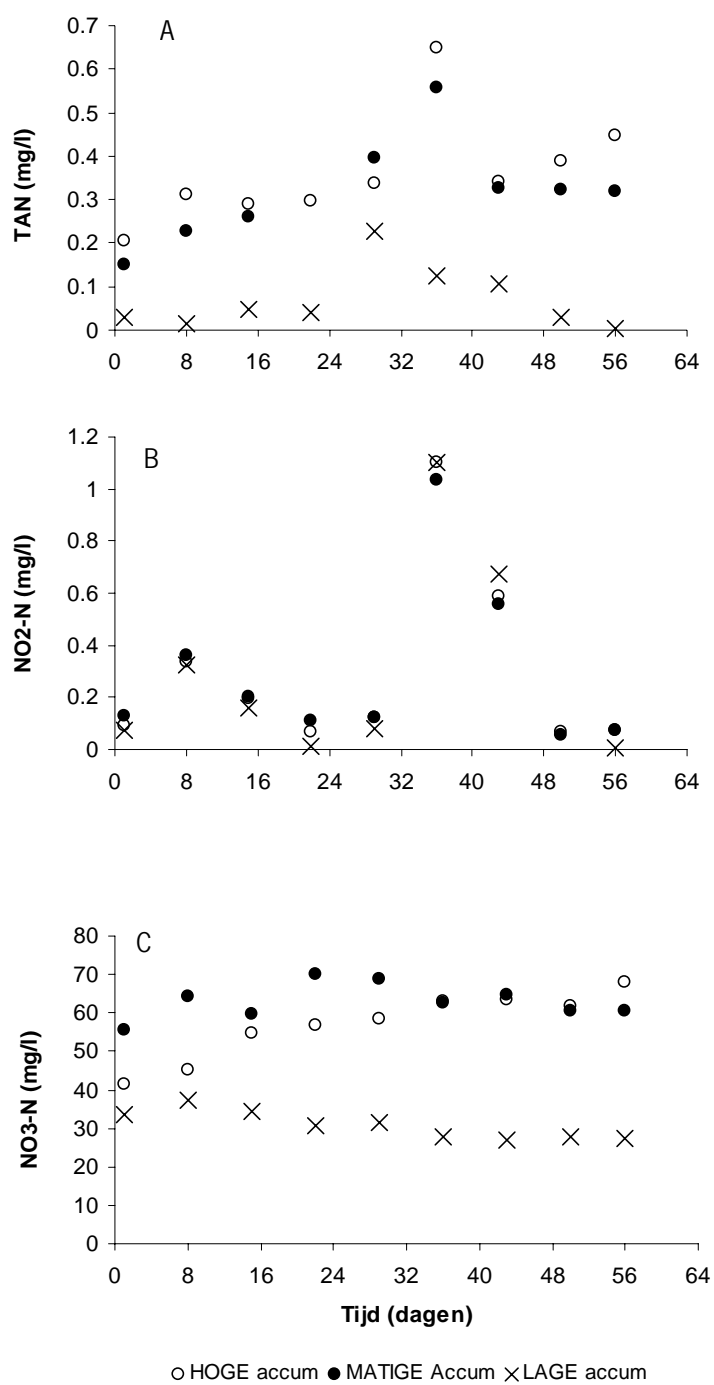
#### *Stress respons*

Er was een trend richting een significant interactie-effect tussen de gewichtscategorieën en de RAS ( $P = 0.086$ ) in de glucosewaarden die 57 dagen na de groeiperiode verkregen werden. Figuur 2.6A vergelijkt deze waarden voor elke gewichtscategorie. Kleine individuen in het LAGE accumulatie RAS hadden significant lagere glucosewaarden dan het HOGE ( $P = 0.014$ ) en MATIGE ( $P = 0.001$ ) accumulatie RAS. Middelgrote vissen, daarentegen, schenen de hoogste glucosewaarden te vertonen in het LAGE accumulatie RAS in vergelijking met de andere 2 RAS. Dit verschil is echter niet significant vanwege de grote inter-individuele variatie. De ACCUMULATIE van stoffen in RAS had ook invloed op de glucosewaarden nadat de acute stress was opgewekt ( $P = 0.005$ ). Vissen in het LAGE accumulatiesysteem vertoonden lagere glucosewaarden in vergelijking met het HOGE accumulatiesysteem ( $P = 0.029$ ). Dit lijkt het geval te zijn voor alle gewichtsklassen (Figuur 2.6B), hoewel er slechts voor de kleine individuen een trend was in de richting van lagere glucoselevels in het LAGE accumulatie RAS in vergelijking met het HOGE accumulatie RAS ( $p = 0.081$ ).

Parallel met de resultaten verkregen voor latentie waren ook de cortisolwaarden (voor de acute stress) significant lager in het MATIGE accumulatiesysteem in vergelijking met de andere 2 systemen ( $P = 0.032$ , Tabel 2.3). Cortisolwaarden werden niet beïnvloed door de mate van accumulatie in het RAS na de opwekking van een stresstest. Er was echter wel een significant interactie-effect tussen het type RAS en de gewichtscategorie voor de cortisolwaarden verkregen na het opwekken van de acute stress ( $P = 0.053$ ). Middelgrote individuen hadden significant hogere cortisolwaarden na de acute stress in het LAGE accumulatie RAS dan in het HOGE ( $P = 0.008$ ) en MATIGE ( $P = 0.047$ ) accumulatie RAS. Ondanks het gebrek aan een significant effect schenen de kleine individuen na acute stress lagere cortisolwaarden te vertonen in het LAGE accumulatie RAS dan in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS (Figuur 2.6D).

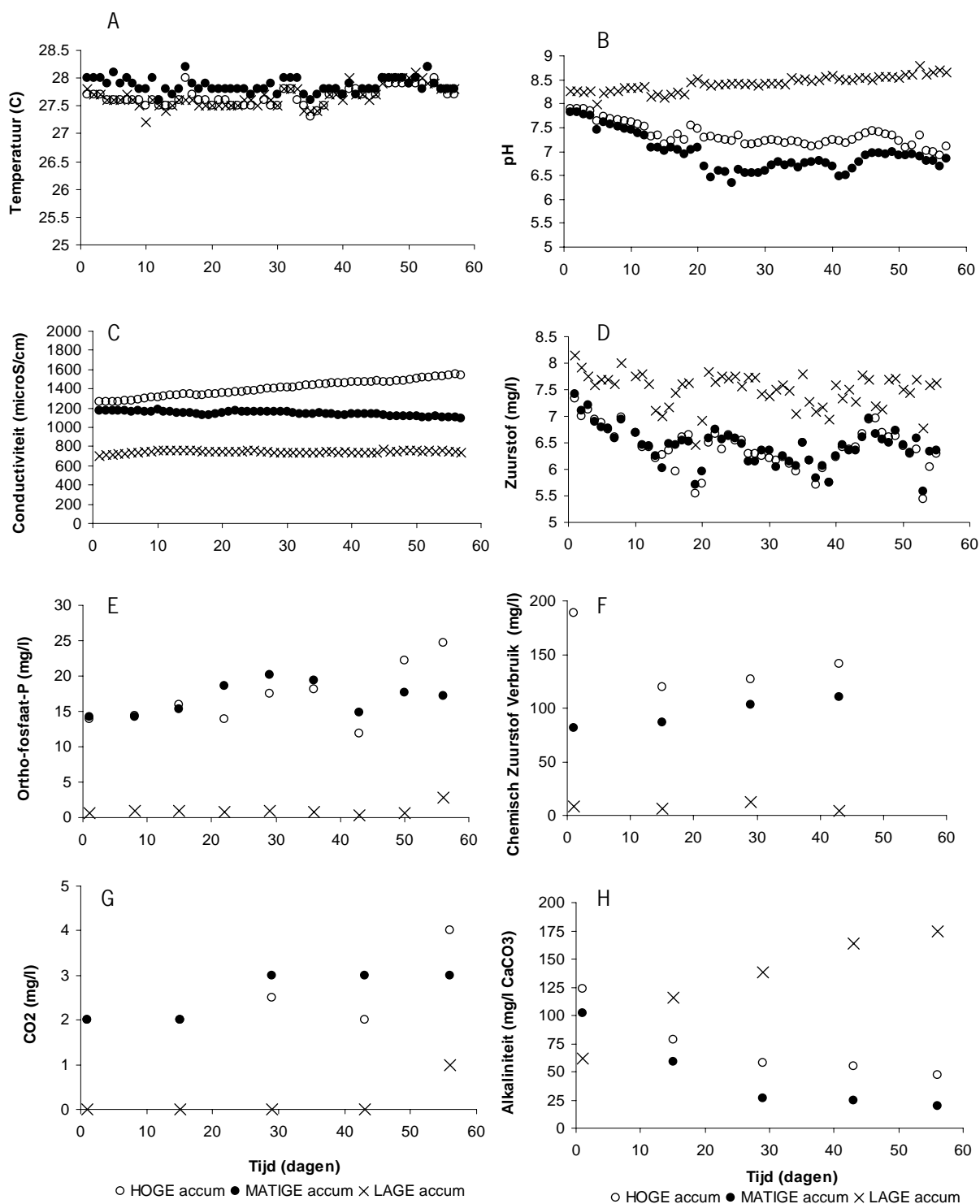
De leucocriet- en hematocrietwaarden werden noch door het type RAS, noch door de interactie tussen gewichtscategorie en RAS beïnvloed (Figuur 2.6E,F).

De glucose- en cortisolwaarden die voor de acute stress test verkregen werden verschilden tussen de gewichtsklassen (Glucose,  $P = 0.099$  en Cortisol,  $P = 0.022$ ), waarbij de kleine individuen de laagste waarden vertoonden. Er was een trend richting een significant lagere hematocrietwaarde bij kleine individuen in vergelijking met grote individuen ( $P = 0.082$ ). De leucocrietwaarde die vlak na de acute stress verkregen werd was echter hoger in kleine individuen in vergelijking met zowel grote ( $P = 0.003$ ) als middelgrote ( $P = 0.02$ ) individuen.



Figuur 2.2. Vergelijking van totaal ammonia stikstof (TAN - A), Nitriet (NO<sub>2</sub>-N - B) en Nitraat (NO<sub>3</sub>-N - C) concentratie gedurende de 57 dagen durende groeiperiode tussen de 3 RAS die onderling verschillen in de mate van GIF-accumulatie.





Figuur 2.3. Vergelijking van de temperatuur (A), pH (B), geleidbaarheid (C), opgeloste zuurstof (D), ortho-fosfaat-P (E), chemisch zuurstofverbruik (CZV) (F), CO<sub>2</sub> (G) en alkaliniteit (H) gedurende de 57 dagen durende groeiperiode tussen de 3 RAS die onderling verschillen in GIF-accumulatie.

Tabel 2.3. Effect van de accumulatie van GIF in RAS, gewichtscategorie en de interactie van RAS \* gewichtscategorie op groeiprestatie, voerinnamegedrag en stressrespons van Nijl Tilapia, *Oreochromis niloticus*.

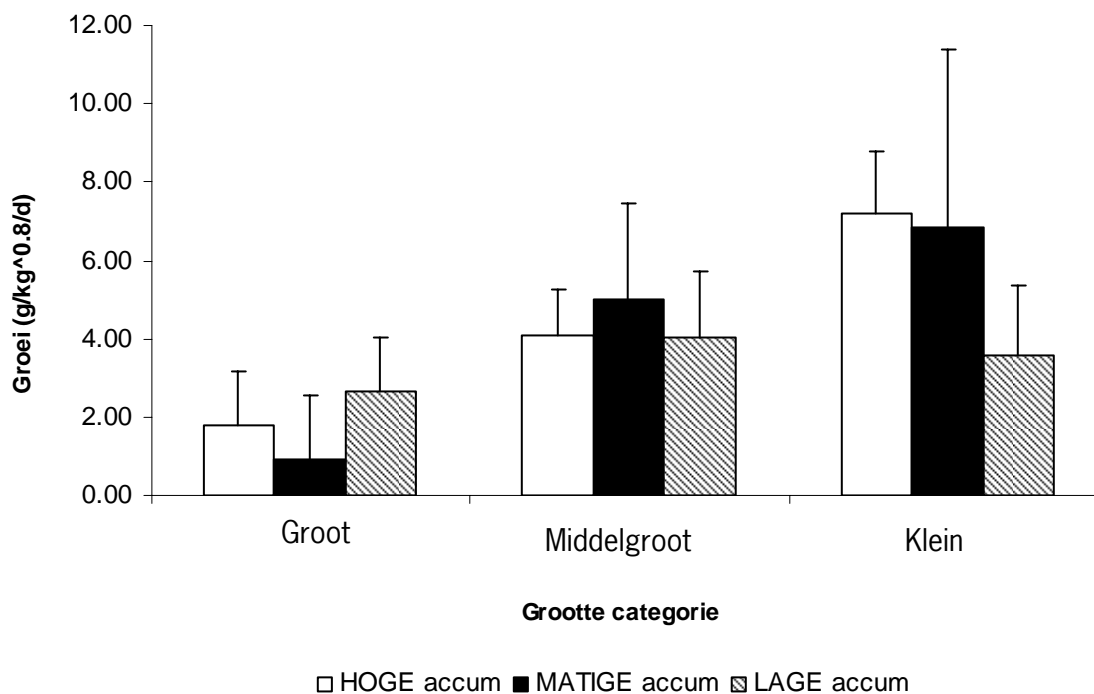
Parameter	RAS			Gewichtscategorie			Hoofdeffecten (p-waarde)		
Groeiprestatie	HOGE accumulatie	MATIGE accumulatie	LAGE accumulatie	GROOT	MIDDELGROOT	KLEIN	RAS	Gewichts- categorie	RAS*Gewichts- categorie
Startlichaams- gewicht (g)	182.26±97.47	173.64±87.25	171.78±86.60	288.73±34.15	162.39±23.41	81.36±20.87	ns	<0.001	ns
Eindlichaams- gewicht (g)	240.68±91.52	232.96±82.95	222.67±103.15	330.82±51.47	230.72±48.24	138.84±45.64	ns	<0.001	ns
Voerinname (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	5.66±2.18	5.82±3.33	5.07±1.64	3.73±1.53	5.61±1.41	7.12±2.88	ns	<0.001	ns
Groei (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	4.36±2.64	4.39±3.91	3.43±1.64	1.83±1.56	4.37±1.83	5.88±3.27	ns	<0.001	0.026
FCR	1.77±1.37	0.97±1.48	1.91±1.64	1.83±2.22	1.33±0.31	1.54±1.50	ns	0.002	ns
Voerinnamegedrag									
Latentie (min)	7.03±5.14	4.63±5.24	8.94±6.41	6.94±5.59	5.51±5.90	8.24±5.88	0.016	ns	Ns
Totale voedertijd (min)	46.69±5.80	45.62±8.47	46.96±7.49	46.21±9.57	47.31±6.12	45.77±5.75	ns	ns	Ns
Stressrespons									
<i>Chronisch</i>									
Glucose (mmol/l)	1.57±0.21	1.56±0.19	1.54±0.63	1.59±0.18	1.59±0.61	1.48±0.24	ns	0.099	0.086
Cortisol (ng/ml)	148.37±125.80	86.86±147.13	143.38±168.39	96.77±124.45	235.25±185.22	61.95±57.50	0.032	0.022	ns
<i>Chronisch +Acuut</i>									
Glucose (mmol/l)	2.90±1.27	2.36±0.49	2.11±0.75	2.75±1.26	2.32±0.75	2.31±0.70	0.005	ns	ns
Cortisol (ng/ml)	183.85±82.69	236.81±172.71	217.92±149.41	179.11±100.43	217.65±136.25	241.81±172.02	ns	ns	0.053
Leucocriet (%)	1.10±0.41	0.99±0.41	1.00±0.35	0.90±0.41	0.90±0.29	1.31±0.31	ns	0.001	ns
Hematocriet (%)	26.21±3.81	26.57±2.99	24.53±5.03	26.21±3.81	26.57±2.99	24.53±5.03	ns	0.088	ns

### Orgaangewichten.

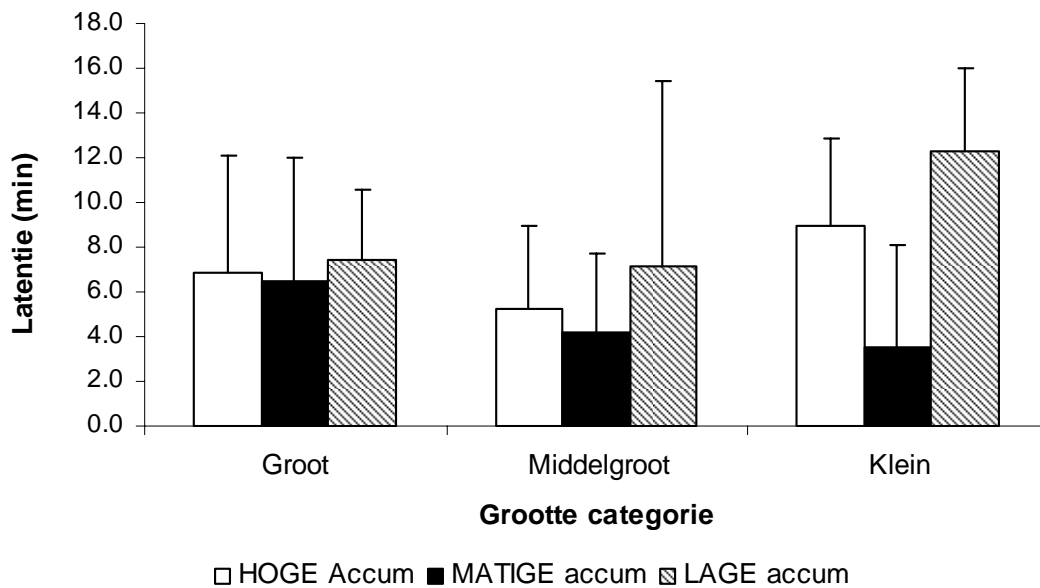
Tabel 2.4 toont dat het niveau van GIF-accumulatie geen effect heeft op de relatieve lever- en miltgewichten.

Tabel 2.4. Het effect van waterverversingssnelheid en gewichtscategorie op het relatieve lever- en miltgewicht (lever- of miltgewicht in g/eindlichaamsgewicht in g\*100).

Behandeling (gemiddelde $\pm$ SD)	Lever (%)	Milt (%)
<b>Waterverversingssnelheid</b>		
RAS 1-HOGE accum.	7.26 $\pm$ 2.98	0.08 $\pm$ 0.05
RAS 2-MATIGE accum.	7.35 $\pm$ 3.01	0.08 $\pm$ 0.06
RAS 3-LAGE accum.	8.02 $\pm$ 3.65	0.08 $\pm$ 0.05
<b>Gewichtscategorie</b>		
Groot	5.10 $\pm$ 0.89	0.05 $\pm$ 0.03
Matig	6.77 $\pm$ 1.03	0.08 $\pm$ 0.06
Klein	11.08 $\pm$ 3.09	0.11 $\pm$ 0.04
<b>Hoofdeffecten (p-waarden)</b>		
Waterverversingssnelheid	ns	ns
Gewichtscategorie	0.000	0.000
Waterverversingssnelheid *	ns	ns
Gewichtscategorie		



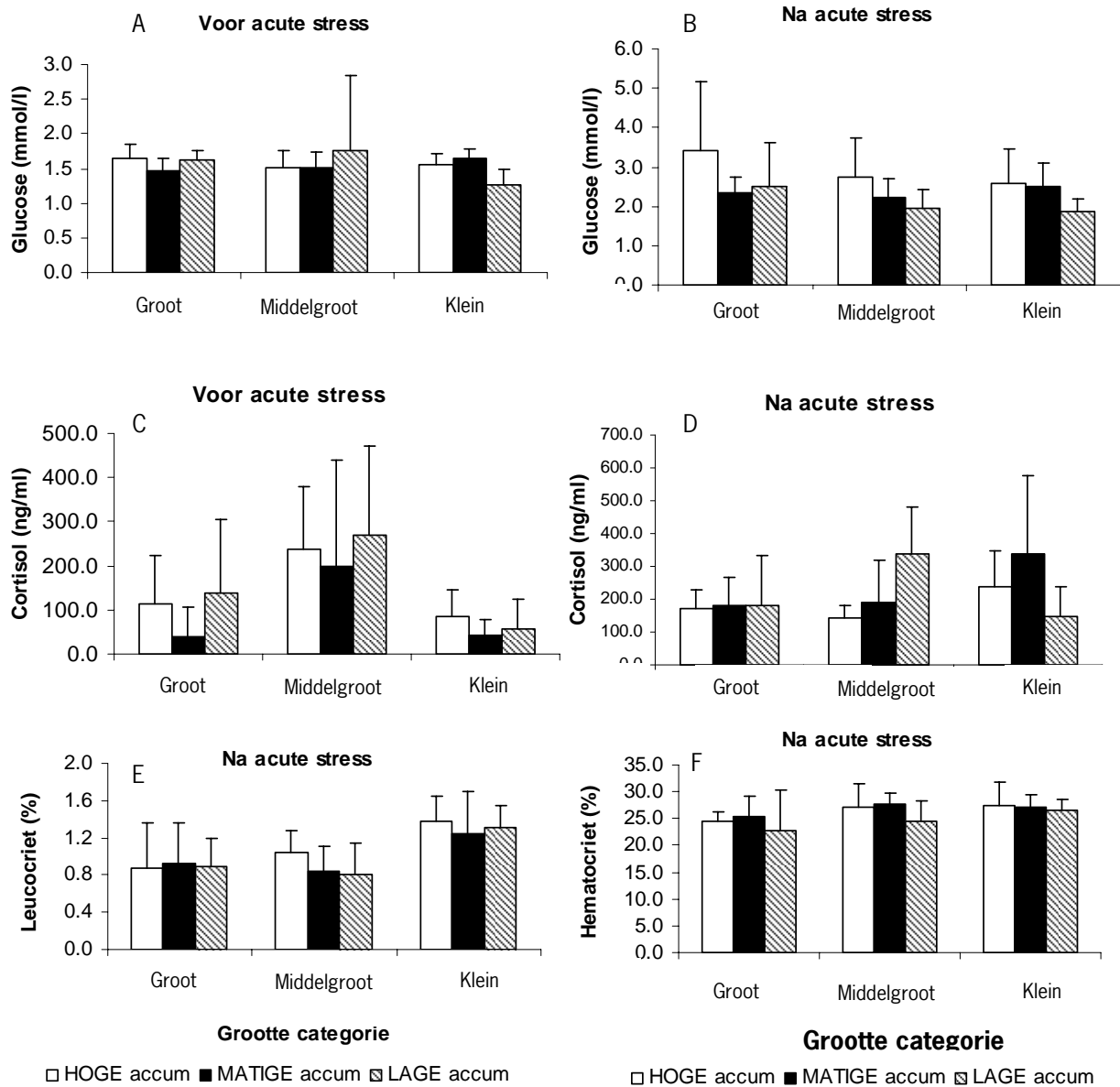
Figuur 2.4. Vergelijking van groeisnelheid in grote, middelgrote en kleine individuen van Nijl Tilapia gekweekt in RAS met verschillende niveau's van GIF-accumulatie.



Figuur 2.5. Vergelijking van voerinnaemotivatie (latentie) in grote, middelgrote en kleine individuen van Nijl Tilapia gekweekt in RAS met verschillende niveau's van GIF-accumulatie.

#### Mineralenaccumulatie

De accumulatie van mineralen in het water van RAS is weergegeven in Tabel 2.5. In het algemeen neemt de concentratie af bij toenemende wateruitwisselingssnelheden, dat suggereert een accumulatie van zware metalen wanneer de RAS draaien met lagere wateruitwisselingssnelheden. Dit is overduidelijk voor ijzer, dat was namelijk 18 keer geconcentreerder in HOGE accumulatie RAS ( $35.42 \pm 9.41 \mu\text{g/l}$ ) dan in LAGE accumulatie RAS ( $2.08 \pm 1.15 \mu\text{g/l}$ ). Ook zink accumuleerde significant in het water, hoewel de hoogste gemiddelde concentratie werd gemeten in MATIGE accumulatie RAS,  $70.38 \pm 16.80 \mu\text{g/l}$ , dat 14 keer geconcentreerder was als in LAGE accumulatie RAS ( $5.00 \pm 1.31 \mu\text{g/l}$ ). Arseen en nikkel verschilden significant tussen alle behandelingen, zelfs tussen HOGE en MATIGE accumulatie RAS, suggererend dat zo'n verschil in dagelijkse wateruitwisselingssnelheid voldoende is om in verschillende mate arseen en nikkel in het water te laten accumuleren. IJzer, mangaan en zink verschilden niet tussen HOGE en MATIGE accumulatie RAS, maar hun concentraties waren wel significant hoger dan in het LAGE accumulatie RAS. Monsters van de lever en spieren van grote en kleine vissen werden verzameld. De mineraalanalyse van deze monsters is nog niet voltooid.



Figuur 2.6. Vergelijking van de stressrespons voor (Glucose – A en Cortisol – C) en na het toedienen van acute stress (Glucose – B, Cortisol – D, Leucocriet – E en Hematocriet - F) in grote, middelgrote en kleine individuen van Nijl Tilapia gekweekt in RAS met verschillende niveaus van GIF-accumulatie.

Tabel 2.5. Samenvatting van de concentratie van mineralen, inclusief zware metalen, gevonden in het water van RAS met verschillende mate van GIF-accumulatie (gemiddelden ( $\pm$  SD) van het effluent van de vistanks)

Mineralen	HOGÉ accum.	MATIGE accum.	LAGE accum.	P-waarde
<b>Zware Metalen (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>				
Aluminum (Al)*	< 30.0			
Arseen (As)	19.85 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup> (17.30 – 21.95)	16.08 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup> (13.84 – 17.48)	7.92 $\pm$ 1.16 <sup>c</sup> (6.03 – 9.30)	<0.001
Cadmium (Cd)	0.30 $\pm$ 0.20 (0.05 – 0.65)	0.15 $\pm$ 0.13 (0.04-0.36)	0.14 $\pm$ 0.13 (0.02-0.27)	ns
Chroom (Cr)*	<1.30			
Koper (Cu)	13.52 $\pm$ 2.49 (11.0 – 18.30)	12.95 $\pm$ 2.77 (10.80 – 18.30)	9.87 $\pm$ 3.46 (5.20 – 15.30)	ns
IJzer (Fe)	35.42 $\pm$ 9.41 <sup>a</sup> (24.40 – 50.10)	25.28 $\pm$ 6.34 <sup>a</sup> (19.10 – 37.20)	2.08 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup> (0.90 – 4.10)	0.001
Mangaan (Mn)	3.88 $\pm$ 2.03 <sup>ab</sup> (1.90 – 7.10)	6.00 $\pm$ 3.29 <sup>b</sup> (1.40 – 10.50)	0.70 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup> (0.30 – 1.80)	0.004
Nikkel (Ni)	8.73 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup> (6.89 – 11.70)	5.34 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup> (4.43 – 6.50)	1.36 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup> (0.80 – 2.53)	<0.001
Lood (Pb)*	< 10.0			
Zink (Zn)	52.90 $\pm$ 21.53 <sup>a</sup> (29.60 – 84.90)	70.38 $\pm$ 16.80 <sup>a</sup> (48.60 – 95.20)	5.00 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup> (3.30 – 6.80)	0.009
<b>Andere mineralen (mg/l)</b>				
Calcium (Ca)	39.62 $\pm$ 5.85 <sup>a</sup> (33.66 – 50.35)	37.77 $\pm$ 3.59 <sup>a</sup> (30.88 – 41.33)	81.68 $\pm$ 4.71 <sup>b</sup> (74.03-86.73)	<0.001
Kalium (K)	138.88 $\pm$ 20.79 <sup>a</sup> (111.80 – 165.20)	91.56 $\pm$ 4.72 <sup>b</sup> (85.80 – 98.58)	6.65 $\pm$ 0.28 <sup>c</sup> (6.39 – 7.13)	<0.001
Magnesium (Mg)	23.90 $\pm$ 2.53 <sup>a</sup> (21.08 – 26.93)	16.95 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup> (15.53 – 17.75)	7.42 $\pm$ 0.60 <sup>c</sup> (6.48 – 8.17)	<0.001
Natrium (Na)	82.25 $\pm$ 3.96 <sup>a</sup> (75.64 – 87.76)	66.05 $\pm$ 18.02 <sup>a</sup> (47.30 – 95.93)	26.34 $\pm$ 1.11 <sup>b</sup> (24.86 – 27.94)	0.001
Fosfor (P)	17.89 $\pm$ 5.60 <sup>a</sup> (13.06 – 26.65)	15.16 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup> (13.30 – 17.99)	0.69 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup> (0.56 – 0.81)	0.001
Zwavel (S)	49.89 $\pm$ 6.36 <sup>a</sup> (41.48 – 57.70)	32.57 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup> (31.49 – 33.51)	8.65 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup> (7.60 – 9.45)	<0.001

\* Beneden detectiegrens; waarden zonder een gemeenschappelijke letter voor het superscript zijn significant verschillend ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 Discussie

Uit dit onderzoek blijkt dat het onwaarschijnlijk is dat groeivertraging optreedt bij kleine en middelgrote Nijl Tilapia die gehouden worden in vrijwel gesloten RAS. In feite vertoonden de kleine individuen zelfs groeistimulering in plaats van groeivertraging bij afnemende waterverversingssnelheid. Er zijn verschillende hypothesen om deze observatie te verklaren.

1) Kleine vissen kunnen voordeel putten uit de accumulatie van organisch materiaal die ontstaat in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS (weerspiegeld in hogere CZV-niveau's). Hoewel het niet gemeten is, werd er geobserveerd dat kleine vissen graasden op het periphyton dat zich ontwikkelde op de wanden van de tanks. Periphyton wordt gedefinieerd als "een verzameling van bevestigde waterplanten en dieren op ondergedompelde substraten, inclusief niet-bevestigde fauna" (van Dam et al., 2002). Er is aangetoond dat periphyton nutritionele waarde heeft (Verdegem et al., 2005). Daarom zou het kunnen dat kleine vissen, die in verhouding met grote vissen hogere metabolische voerinnamen hebben (Hepher, 1988), hun extra nutritionele behoeften uit het HOGE accumulatie RAS hebben gehaald.

2) Een andere mogelijkheid om de hogere groeisnelheid bij kleine vissen in HOGE accumulatie RAS te verklaren, kan de verlaagde gevoeligheid voor de accumulatie van GIF, als een gevolg van de lagere pH in het HOGE en MATIGE accumulatie RAS, zijn. Bij zalmachtigen is het aangetoond dat lage pH een chemische verandering in de visalarmstoffen kan veroorzaken (Brown et al. 2002; Leduc et al. 2004). Tevens is aangetoond dat het lage pH olfactorische desensibilisatie kan veroorzaken (Moore, 1994).

3) Naast de lage pH waarden kan ook de accumulatie van humuszuren, eveneens karakteristiek voor RAS die draaien bij een lage waterverversingssnelheid, bijgedragen hebben aan de sterkere groei in deze systemen in vergelijking met de systemen die draaien bij een hogere waterverversingssnelheid: humuszuren kunnen andere stoffen (bijvoorbeeld sterioïde pheromonen) 'inkapselen' in waterige omgevingen en daardoor de mogelijkheid van vissen om deze chemische signalen te detecteren significant verminderen (Hubbard et al., 2002). Het zou kunnen dat de gevoeligheid van vissen voor GIF verschilt tussen de gewichtscategorieën en dat kleinere individuen minder gevoelig zijn voor GIF-accumulatie in het systeem dan grotere individuen. In kleinere individuen zou de desensitisatie van het olfactorische systeem ten gevolge van pH sterker kunnen zijn of sneller op kunnen treden dan in grotere individuen. Deze hypothese vereist verder onderzoek.

## 2.5 Conclusie

Deze studie toonde aan dat:

- Jonge exemplaren van Nijl Tilapia tot  $\pm 150$ g kunnen worden gekweekt in vrijwel gesloten recirculatiesystemen (30L kg voer/dag) zonder een afname in voerinnamemotivatie, voerinnamen, voederconversie en groei.
- Grotere individuen ( $\pm 300$ g) kunnen groeivertraging vertonen en dus zullen studies met grotere aantallen grote individuen overwogen moeten worden om deze hypothese verder te onderzoeken.

### 3. De accumulatie van stoffen in Recirculatie Aquacultuur Systemen (RAS) hebben effect op embryonale en larvale ontwikkeling bij gewone karper (*Cyprinus carpio*)

Catarina Martins en Ep Eding  
Leerstoelgroep Aquacultuur en Visserij, Wageningen Universiteit.

#### 3.1 Doelstellingen

Men mag verwachten dat, indien gerecirculeerd water van RAS de groei van jonge vissen beïnvloed door een mogelijke accumulatie van GIF, het effect op de vroege ontwikkelingsfase nog signifikanter zou moeten zijn. Zo'n bioassay kan, wanneer ontwikkeld, een gereedschap vormen om te testen tot hoe ver boeren hun water-recirculatiepercentage kunnen verhogen. Dit onderzoek is bedoeld om de eerste stap te zijn richting de ontwikkeling van zo'n bioassay. Het doel van dit onderzoek is dan ook om het effect dat stoffen, die accumuleren in een RAS, hebben op de ontwikkeling van gewone karper (*Cyprinus carpio*) in de vroege levensfase te onderzoeken.

#### 3.2 Materiaal en Methoden

Voor dit experiment werd water uit twee RAS gebruikt. Een daarvan draaide op 30L/kg voer (RAS 1, HOGE accumulatie van stoffen) en de andere op 1500L/kg voer (RAS 2, LAGE accumulatie). De RAS zijn beschreven in Martins et al., 2007. Het water uit de RAS werd gefilterd door middel van een ultrafiltratiemembraan met een poriëgrootte van 0.03 µm alvorens gebruikt te worden in een ei-incubatie-eenheid. De incubatie-eenheid bestond uit een buffer- en een incubatietank. De buffertank (30L) werd gebruikt om het water uit het RAS te introduceren en van daaruit in de incubatietank te pompen. Het volledige volume van de buffertank werd elke dag vervangen door nieuw gefilterd water uit het RAS. Dit werd gedaan om een dagelijkse toevoeging van opgeloste stoffen, met een oorsprong in het RAS, te verzekeren. De incubatietank (35L) bevatte de ei-incubatoren, larventanks (2L) en een digitale thermostaat om de temperatuur constant te houden gedurende het experiment. 15 ei-incubatoren werden gebruikt voor elk RAS. Na het uitkomen werden de larven overgebracht naar rechthoekige, 2L plastic tanks. Karperlarven werden gevoed met *Artemia nauplii* na de resorptie van de dooierzak op 2-3 dnu (dagen na uitkomen) en tot het einde van het experiment (7 dagen na het starten van exogene voeding). De waterkwaliteit werd gecontroleerd op temperatuur, geleidbaarheid, pH, opgeloste zuurstof, ammoniak, nitriet, nitraat, ortho-fosfaat-P, bicarbonaat en samenstellingen van zware metalen (Al, As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb en Zn). De gemeten parameters aan de hand waarvan de ontwikkeling in de vroege levensfase werd beoordeeld waren: ei- en larvesterfte, percentage uitgekomen eieren en dynamiek in het uitkomen, misvormingspercentage, optreden van de bloedcirculatie, oogpigmentatie, aanzet van de borstvin, hartslag en staartbeweging, uitputting van de dooierzak en ten slotte lengte en gewicht van de larve. Embryonale ontwikkeling werd bepaald volgens de beschrijving van Oyen et al. (1991).

#### 3.3 Resultaten

In Tabel 3.1 zijn de verschillen in waterkwaliteit tussen de behandelingen samengevat. Tabel 3.2 geeft het effect van gerecirculeerd water op de embryonale en larvale ontwikkeling van gewone karper weer. Water uit HOGE accumulatie RAS veroorzaakte hogere sterfte zowel tijdens de embryonale als de larvale ontwikkeling. Dit werd ook weerspiegeld in lagere percentages uitgekomen eieren in het HOGE accumulatie RAS dan in het LAGE accumulatie RAS (1500L/kg voer). Echter, de uitgekomen larven in het LAGE accumulatie RAS hadden een significant hoger aantal misvormingen dan de larven in het HOGE accumulatie RAS. Bepaalde ontwikkelingsfasen tijdens de embryonale ontwikkeling kwamen eerder voor in embryo's geïncubeerd bij 30L/kg voer dan bij embryo's geïncubeerd bij 1500L/kg voer. Deze versnelde ontwikkeling werd gevolgd door een versnelde resorptie van het materiaal uit de dooierzak. Ondanks deze versnelde ontwikkeling in het HOGE accumulatie RAS was de lengte en het drooggewicht van de larven, 7 dagen na de start van exogene voeding, hoger in het LAGE



accumulatie RAS dan in het HOGE accumulatie RAS. In het HOGE accumulatie RAS was de pH significant lager dan in het LAGE accumulatie RAS. Geleidbaarheid, ammoniak, nitriet, nitraat, fosfaat, As, Cu, Mn, Ni en Zn waren significant hoger in het HOGE accumulatie RAS dan in het LAGE accumulatie RAS. Temperatuur en opgeloste zuurstof verschilden niet tussen de behandelingen.

Tabel 3.1. Waterkwaliteitsparameters van het ultragefiltreerde water van de HOGE en LAGE accumulatiebehandelingen, gebruikt om eieren te incuberen en larven van karper op te kweken (N=10 voor temperatuur, pH, geleidbaarheid en opgeloste zuurstof; N= 3 voor TAN, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - N, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - N, Ortho-Fosfaat -P and totaal bicarbonaat; N=2 voor mineralen).

Waterkwaliteitsparameter	HOGE accumulatie	LAGE accumulatie	P-waarde
Temperatuur (°C)	24.0 ± 0.0	24.0 ± 0.0	>0.05
pH	7.2 – 7.3	8.5 - 8.6	0.00
Geleidbaarheid (µS/cm)	1304.2 ± 10.1	586.9 ± 9.6	0.00
Opgeloste Zuurstof (mg/L)	8.5 ± 0.0	8.5 ± 0.0	>0.05
TAN (mg/L)	0.15± 0.04	0.02± 0.01	0.09
NH <sub>3</sub> – N*(mg/L)	0.001 ± 0.0	0.004 ± 0.002	>0.05
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N (mg/L)	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.01
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N (mg/L)	65.3 ± 1.0	14.8± 0.1	0.00
Ortho-Fosfaat -P (mg/L)	19.5±1.0	0.51±0.0	0.00
Totaal bicarbonaat (mg/L)	18.5±1.8	169.4±1.5	0.00
Mineralen (µg/L)			
Aluminum (Al)	< 30**	< 30**	0.00
Arseen (As)	19.00±0.00	8.00±0.00	
Cadmium (Cd)	< 0.19**	< 0.19**	
Chroom (Cr)	<1.30**	< 1.30**	0.00
Koper (Cu)	59.00±1.00	13.50±3.50	0.00
Mangaan (Mn)	5.00±1.00	1.50±0.050	0.00
Nikkel (Ni)	9.30±0.40	2.20±0.40	
Lood (Pb)	< 10**	< 10**	0.00
Zink (Zn) (mg/L)	145.50±3.50	84.50±44.50	0.00
Calcium (Ca)	45.00± 2.30	75.45±5.85	0.00
Kalium (K)	112.50±4.50	6.30±1.30	0.00
Magnesium (Mg)	20.70±0.80	7.46±0.87	0.00
Natrium (Na)	56.85±0.95	23.15±3.75	
Ijzer (Fe)	< 0.01**	< 0.01**	0.00
Fosfor (P)	17.00±0.30	0.61±0.11	0.00
Zwavel (S)	38.85±1.65	7.92±1.09	

\*\* Onder detectiegrens

### 3.4 Discussie

Eenzijds leidt HOGE accumulatie water tot hogere eier- en larvesterfte, lagere uitkomstpercentages en lagere larvelengte en larvegewicht, maar anderzijds tot lagere percentages misvormingen en snellere embryonale en dooierzak-larve ontwikkeling. Ondanks het lagere percentage misvormingen in HOGE accumulatie water dan in LAGE accumulatie water was het aantal dode eieren in HOGE accumulatie water weer hoger. Onze hypothese is dat de negatieve invloed van HOGE accumulatie water op de embryonale ontwikkeling zodanig was dat de embryo's niet in staat waren verder te ontwikkelen. De versnelde embryonale en dooierzak-larve ontwikkeling die waargenomen werd in water van het HOGE accumulatie RAS kan het gevolg zijn geweest van een toegenomen metabolische activiteit.. Luckenbach et al. (2003) toonde aan dat een versnelde ontwikkeling in de vroege levensfase optrad bij bruine forel die blootgesteld werd aan xenobiotica. Mogelijke verklaringen voor de geobserveerde verschillen in embryonale en larvale ontwikkeling kunnen gerelateerd zijn aan de verschillen in waterkwaliteitsparamters. De volgende parameters zouden beschouwd kunnen worden als potentiële GIF:

### Ortho-fosfaat

Fosfaatniveaus verschilden significant tussen RAS (HOGE accumulatie RAS water:  $19.45 \pm 0.89$  mg/l; LAGE accumulatie RAS water:  $0.51 \pm 0.01$  mg/l). Toor et al. (1983) toonde aan dat niveaus van  $>0.12$  mg/l resulteerden in verminderde uitkomst en verhoogde incidentie van larvale misvormingen bij karpers. Deze resultaten bevestigen voor een deel de resultaten gevonden in dit onderzoek aangezien er wel een verminderde uitkomst maar geen verhoogde incidentie van misvormingen werd geobserveerd in de incubatie-eenheid waarin water gebruikt werd van een HOGE accumulatie RAS in vergelijking met de incubatie-eenheid waarin water gebruikt werd van het LAGE accumulatie RAS.

Tabel 3.2. Samenvatting van de belangrijkste verschillen gevonden in de ontwikkeling in de vroege levensfase van gewone karper na blootstelling aan twee verschillende niveaus van waterverversing (HOGE accumulatie RAS, 30L/kg voer en LAGE Accumulatie RAS 1500L/kg voer). De waarden zijn gemiddelden  $\pm$  SD. Statistische test: \*Onafhankelijke t-test, \*\*Chi-square test; unb = uren na bevruchting.

Parameter	HOGE accumulatie RAS (30L/kg voer)	LAGE accumulatie RAS (1500L/kg voer)	P-waarde
Ei-sterfte (%)*	$18.1 \pm 2.0$	$10.5 \pm 21.3$	0.012
Uitkomst % *	$82.0 \pm 2.0$	$89.0 \pm 1.3$	0.000
Misvorming %*	$9.4 \pm 1.5$	$24.0 \pm 1.1$	0.000
Embryonale ontwikkeling (% van voorkomen)**			
Hartslag – 26 unb	88	68	0.028
Oogpigmentatie – 30 unb	86	88	$>0.05$
Bloedcirculatie – 30 unb	76	48	0.007
Aanzet v. borstvin – 34 unb	70	48	0.041
Staartbeweging – 50 unb	100	80	0.001
Uitputting v. dooierzak ( $\text{mm}^2/24\text{u}$ )*	$0.12 \pm 0.01$	$0.07 \pm 0.01$	0.004
Lengte van larve (mm)*	$11.93 \pm 0.4$	$13.46 \pm 0.3$	0.015
Droog gewicht van larve (mg)*	$2.09 \pm 0.09$	$3.01 \pm 0.08$	0.000
Larvesterfte (%)*	$19.8 \pm 1.2$	$10.0 \pm 0.9$	0.000

### Nitraat

In het huidige onderzoek was nitraat  $14.8 \pm 0.07$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  en  $65.3 \pm 0.94$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  in respectievelijk de LAGE en HOGE accumulatiebehandeling. Deze waarden schijnen boven de tolerantielimieten van vroege levensfasen van zoetwatervissen te liggen. Nitraatniveaus van  $1.1 - 4.5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  worden als mild-toxisch beschouwd voor vroege levensfasen van regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*), de Chinookzalm (*Oncorhynchus tshawytscha*), Steelhead-forel (*Salmo gairdneri*) en Cutthroat-forel (*Salmo clarki*) (Kincheloe et al., 1979). McGurk et al. (2006) toonde aan dat de acute (96-h) mediane lethale concentratie (LC50) voor larven  $1.1$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  was voor Amerikaanse meerforel *Salvelinus namaycush* en  $1.9$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  voor de marene *Coregonus clupeaformis*.

### Zware metalen: Arseen en koper

Nayak et al. (2007) toonde aan dat arseen-niveaus van  $2$  en  $10$   $\mu\text{g/L}$  (beiden worden beschouwd als veilige niveaus in drinkwater) effect hebben op de immuunreactie van zebravissen. Daarom zou het kunnen dat de waarden die in het huidige onderzoek gevonden werden ( $19$  en  $8$   $\mu\text{g/L}$  in respectievelijk het HOGE en LAGE accumulatiebehandelingen) de normale embryonale ontwikkeling van de gewone karper verhinderden. De waarden gemeten voor koper in het HOGE en LAGE accumulatie RAS (respectievelijk  $59.0 \pm 1.0$   $\mu\text{g/L}$  en  $13.5 \pm 3.5$   $\mu\text{g/L}$ ) zijn ver boven de waarden waarvoor aangetoond is dat ze het uitkomen van eieren bij zebravissen belemmeren (namelijk  $0.05$   $\mu\text{g/L}$ , Dave and Xiu, 1991). Wanneer men de vorige waarden vergelijkt zou men een sterker effect op de embryonale en larvale ontwikkeling van de gewone karper kunnen verwachten wanneer deze gekweekt worden in HOGE accumulatie water. Of koper biologisch beschikbaar was in het HOGE accumulatie water om de geobserveerde verschillen te verklaren is nog niet duidelijk.

### 3.5 Conclusies

Dit onderzoek toonde aan dat embryonale en larvale ontwikkeling van gewone karper beïnvloed worden door sterk gecirculeerd water.

In het HOGE accumulatie water belemmeren de concentraties van ortho-fosfaat-P, nitraat en de zware metalen arseen en koper waarschijnlijk de embryonale en larvale ontwikkeling en verdienen derhalve verder onderzoek als GIF in RAS .

## 4. Groeivertraging bij vis – Is die soortspecifiek?

Catarina Martins en Ep Eding  
Leerstoelgroep Aquacultuur en Visserij, Wageningen Universiteit.

### 4.1 Doelen

Het doel van dit onderzoek was het voorkomen van groeivertraging aan te tonen bij 3 soorten vis, Nijl Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Afrikaanse Meerval (*Clarias gariepinus*) en Europese aal (*Anguilla*), die gekweekt werden in hetzelfde RAS. In Experiment 1 werd geprobeerd om groeivertraging te karakteriseren door individueel gehuisveste vissen te gebruiken. Omdat deze vissen lage voerinname en groeisnelheden vertoonden in vergelijking met commerciële omstandigheden, werd dit experiment zowel met individuele als groepsgewijs gehuisveste Nijl Tilapia uitgevoerd.

### 4.2 Materiaal en methoden

Er werden twee RAS (RAS 1 en RAS 2) gebruikt. RAS 1 (HOGE accumulatie RAS) draaide met een waterverversingssnelheid van 30 L/kg voer terwijl RAS 2 (LAGE accumulatie RAS) draaide met een waterverversingssnelheid van 1500 L/kg voer (deze systemen zijn hetzelfde als die uit het vorige experiment). In beide systemen werden de experimentele vissen (tilapia, aal en meerval) groepsgewijs gehuisvest in een totaal van negen (9) 70-L glazen tanks en individueel gehuisvest (alleen tilapia) in twaalf (12) 40-L glazen tanks. In het HOGE accumulatie RAS deelden de tanks met experimentele vissen de wateraanvoer met 4 kweektanks (capaciteit: 450 L) waarin kweekcondities in commerciële viskwekerijen werden gesimuleerd en die een potentiële bron van GIF vormden. Het LAGE accumulatie RAS was niet verbonden met de kweektanks. Beluchting in de tanks met experimentele vissen werd aangepast om voldoende zuurstofvoorziening te verzekeren. Wateraanvoer naar de experimentele tanks werd aangepast aan een stroomsnelheid van 1.5 - 2 L/min voor de individueel gehuisveste Nijl Tilapia; 4 L/min voor de Afrikaanse meerval en 6-8 L/min voor de Nijl Tilapia en Europese aal. Een commercieel tilapiadieet (drijvende pellets: grootte 3mm, 44% ruw eiwit, 10% vet, 25% koolhydraten en 11.5% as) werd gebruikt gedurende het experiment (adaptatie- en experimentele fase). Dezelfde pellets werden gebruikt voor alle vissoorten om mogelijke bijdragen van GIF uit andere voersamenstellingen te voorkomen. De experimentele vissen werden tweemaal daags gedurende een periode van 90 minuten handmatig *ad-libitum* gevoerd (08:00 en 15:00 uur). Tijdens deze voerperiode werd de volgorde van de tanks m.b.t. voeren at random bepaald. Pellets werden per tank verstrekt in een opeenvolgende reeks van 5 pellets per keer. Een nieuwe portie pellets werd pas toegevoegd wanneer de eerste portie volledig geconsumeerd was of er werden enkele pellets toegevoegd om het aantal van 5 pellets in stand te houden om te zorgen dat de vissen ten alle tijden toegang hadden tot het voer. De pellets werden in een drijvende voederring verstrekt om visuele observatie van de voerinname mogelijk te maken. Na negentig minuten werden de overgebleven pellets verzameld en geteld. Voeding werd willekeurig gedaan. Vissen in de kweektanks werden gedurende 24-uur gevoerd met een 24-uurs bandvoer automaat. De totale duur van het experiment omvatte 39 dagen gedurende welke de waterkwaliteitsparameters en dagelijkse voerinname werden bepaald. Aan het begin en het eind van het experiment werd het lichaamsgewicht bepaald.

### 4.3 Resultaten

Tabel 4.1 toont de verschillen in waterkwaliteit tussen de RAS met HOGE en LAGE accumulatie van GIF. De prestatieresultaten in Tabel 4.2 tonen aan dat het HOGE accumulatie RAS de oorzaak is van een lage voerinname, voederconversie en groeiprestatie voor zowel de individueel gehuisveste als voor de groepsgehuisveste Nijl Tilapia in verhouding met het LAGE accumulatie RAS. Dit suggereert het bestaan van groeiremming voor Nijl Tilapia. Er was geen significant verschil in voerinname, voederconversie en groeiprestatie voor de Afrikaanse meerval en Europese aal die gekweekt werden in het LAGE accumulatie RAS en het HOGE accumulatie RAS.

Tabel 4.1. Verschillen in de waterkwaliteit tussen de behandelingen. RAS 1 is het HOGE GIF-accumulatie systeem (30 L/kg voer); RAS 2 is het LAGE GIF accumulatie systeem (1500 L/kg voer). Watermonsters werden genomen uit het vistankeffluent van elk systeem.

Parameter	RAS 1 (HOGE accumulatie) (30L/kg voer)	RAS 2 (LAGE accumulatie) (1500 L/kg voer)
Temperatuur (°C)	26.00 ± 0.16	25.92 ± 0.08
pH	6.70	7.37
Geleidbaarheid (µS/cm)	1754.95 ± 89.58	334.54 ± 77.59
Zuurstof (mg/L)	7.04 ± 0.43	6.04 ± 0.53
TAN (mg/L)*	0.20 ± 0.19	0.16 ± 0.03
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)*	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.01
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)*	88.35 ± 5.21	17.02 ± 2.67
Ortho-fosfaat (mg/L)*	17.5 ± 0.91	1.12 ± 0.28
Bicarbonaat (mg/L)*	9.67 ± 3.85	33.38 ± 11.8

\* Waarden verkregen met behulp van een autoanalyser.

#### 4.4 Discussie

Ondanks de lage groeiprestatie van zowel de groepsgewijs als individueel gehuisveste vis was het effect van accumulatie in RAS op de groei van Nijl Tilapia vergelijkbaar bij zowel de groepsgewijs als de individueel gehuisveste vissen. Dit suggereert dat het type huisvesting, hoewel het de absolute niveaus van voerinname wel beïnvloedt, geen invloed uitoefent op het algemene effect van de behandeling. Vergelijkbare resultaten werden gevonden bij Afrikaanse meerval.

Tabel 4.2 laat zien dat alleen de groei van tilapia werd beïnvloed door de accumulatie van stoffen in RAS. De groei van aal en meerval werd niet beïnvloed. Bij paling zou men in vergelijking met tilapia en meerval een hogere gevoeligheid voor de accumulatie van groeiremmende stoffen verwachten. Van paling is het nl. bekend dat ze erg gevoelig zijn voor waterkwaliteit, waarschijnlijk ten gevolge van het vetgehalte in lichaamswefsel welke de accumulatie van lipofiele en persistente verontreinigingen bevorderen (Agradi et al., 2000). Men zou daarom een effect op de groei van aal hebben kunnen verwachten indien GIF systeemgerelateerd zou zijn. Aangezien dit niet het geval is suggereert dit dat GIF visgerelateerd is. Het type van de visgerelateerde GIF is echter onbekend. Verder onderzoek is nodig om deze waarneming te onderbouwen.

#### 4.5 Conclusies

Groeivertraging schijnt zich voor te doen in grote gewichtsklassen van Nijl Tilapia (zowel individueel gehuisveste als groepsgehuisveste vissen vertoonden een hogere groeiprestatie in het LAGE accumulatie RAS) Afrikaanse meerval en Europese aal vertonen geen groeivertraging wanneer ze gekweekt worden in een tilapia RAS.

Tabel 4.2. Gemiddelden ( $\pm$  SD) van de groeiprestatieparameters (eindlichaamsgewicht, voerinname, voederconversie (VC), specifieke groeisnelheid (SGS), relatieve groeisnelheid per metabolisch gewicht (RGR = relative growth rate of metabolic weight) en relatieve voerinname per metabolisch gewicht (RFI = relative feedintake of metabolic weight) waargenomen tijdens de experimentele periode.

Vissoort/Parameter	HOGÉ accumulatie RAS	LAGE accumulatie RAS	P-waarde
Individueel gehuisveste vissen			
Nijl Tilapia – (inclusief <i>uitbijters</i> )			
Uiteindelijk lichaamsgewicht (g)	280.39 $\pm$ 70.81	290.15 $\pm$ 54.40	N.S
Voerinname (g/vis/dag)	1.07 $\pm$ 1.04	1.39 $\pm$ 0.93	N.S
VC (g/g)	1.10 $\pm$ 20.13	24.39 $\pm$ 73.41	N.S
SGR (%/dag)	0.04 $\pm$ 0.30	0.18 $\pm$ 0.29	N.S
RGR (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	0.34 $\pm$ 2.44	1.44 $\pm$ 2.37	N.S
RFI(g/kg <sup>0.8</sup> /d)	2.84 $\pm$ 2.16	3.80 $\pm$ 2.18	N.S
Nijl Tilapia – (exclusief <i>uitbijters</i> )			
Uiteindelijk lichaamsgewicht (g)	262.92 $\pm$ 47.00	279.30 $\pm$ 41.25	N.S
Voerinname (g/vis/dag)	0.74 $\pm$ 0.14	1.15 $\pm$ 0.42	0.011
VC (g/g)	1.09 $\pm$ 21.35	26.50 $\pm$ 76.61	N.S
SGR (%/dag)	-0.06 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.13	0.003
RGR (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	-0.42 $\pm$ 0.51	0.82 $\pm$ 1.01	0.003
RFI(g/kg <sup>0.8</sup> /d)	2.17 $\pm$ 0.37	3.27 $\pm$ 1.22	0.015
Groepsgehuisveste vissen			
Nijl Tilapia			
Uiteindelijk lichaamsgewicht (g)	279.96 $\pm$ 7.25	316.95 $\pm$ 12.78	0.020
Voerinname (g/vis/dag)	1.34 $\pm$ 0.28	2.37 $\pm$ 0.32	0.014
VC (g/g)	9.28 $\pm$ 7.75	1.63 $\pm$ 0.19	N.S
SGR (%/dag)	0.09 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.13	0.014
RGR (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	0.68 $\pm$ 0.53	4.04 $\pm$ 0.99	0.013
RFI(g/kg <sup>0.8</sup> /d)	3.75 $\pm$ 0.80	6.45 $\pm$ 0.83	0.015
Afrikaanse meerval			
Uiteindelijk lichaamsgewicht (g)	503.60 $\pm$ 15.30	604.45 $\pm$ 141.96	N.S
Voerinname (g/vis/dag)	6.15 $\pm$ 0.04	6.58 $\pm$ 0.88	N.S
VC (g/g)	0.97 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.19	N.S
SGR (%/dag)	1.75 $\pm$ 0.09	2.20 $\pm$ 0.59	N.S
RGR (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	14.51 $\pm$ 0.78	18.95 $\pm$ 5.93	N.S
RFI(g/kg <sup>0.8</sup> /d)	13.98 $\pm$ 0.21	13.99 $\pm$ 0.74	N.S
Europese aal			
Uiteindelijk lichaamsgewicht (g)	74.73 $\pm$ 3.25	82.58 $\pm$ 4.03	N.S
Voerinname (g/vis/dag)	0.65 $\pm$ 0.12	0.87 $\pm$ 0.11	N.S
VC (g/g)	3.36 $\pm$ 1.03	2.36 $\pm$ 0.49	N.S
SGR (%/dag)	0.33 $\pm$ 0.11	0.51 $\pm$ 0.13	N.S
RGR (g/kg <sup>0.8</sup> /d)	1.94 $\pm$ 0.66	3.06 $\pm$ 0.82	N.S
RFI(g/kg <sup>0.8</sup> /d)	6.08 $\pm$ 0.55	6.96 $\pm$ 0.74	N.S

## 5. Effect van sorteren op groeivertraging bij Nijl Tilapia

Catarina Martins en Ep Eding  
Leerstoelgroep Aquacultuur en Visserij, Wageningen Universiteit.

### 5.1 Doelstellingen

Recirculatie Aquacultuur Systemen (RAS) representeren een technologische benadering om veel van de milieu-gerelateerde problemen van de aquacultuur, zoals waterverbruik en afvaluitscheiding, op te lossen. De trend bij deze systemen is om de waterverversingssnelheid te verlagen en daardoor de waterretentietijd in het systeem te verhogen. Aan de ene kant levert deze trend grotere milieutechnische voordelen, maar aan de andere kant wekt deze de zorg op over de ophoping van stoffen die de vissen zelf uitscheiden in het water en die de prestatie en welzijn van deze vissen negatief beïnvloeden. Een van deze stoffen zou cortisol kunnen zijn. Het is bekend dat cortisol wordt uitgescheiden in het water als een gevolg van stress (Ellis et al., 2004). In een RAS is een veel voorkomende stressfactor het vangen en de behandeling tijdens het sorteren. Wanneer verschillende gewichtscategorieën in hetzelfde RAS gehouden worden is de kans groot dat de sortering binnen die gewichtscategorieën op verschillende tijden uitgevoerd wordt. Wanneer een groep vissen in een RAS gestresst wordt kan dit effect hebben op andere groepen die niet direct gestresst worden maar wel hetzelfde water delen. Het doel van dit onderzoek was dan ook om het effect te bepalen van het stressen van een groep vissen, door het simuleren van een sorteringsprocedure, op de voerinnamemotivatie van andere vissen die niet gestresst werden maar wel hetzelfde RAS deelden.

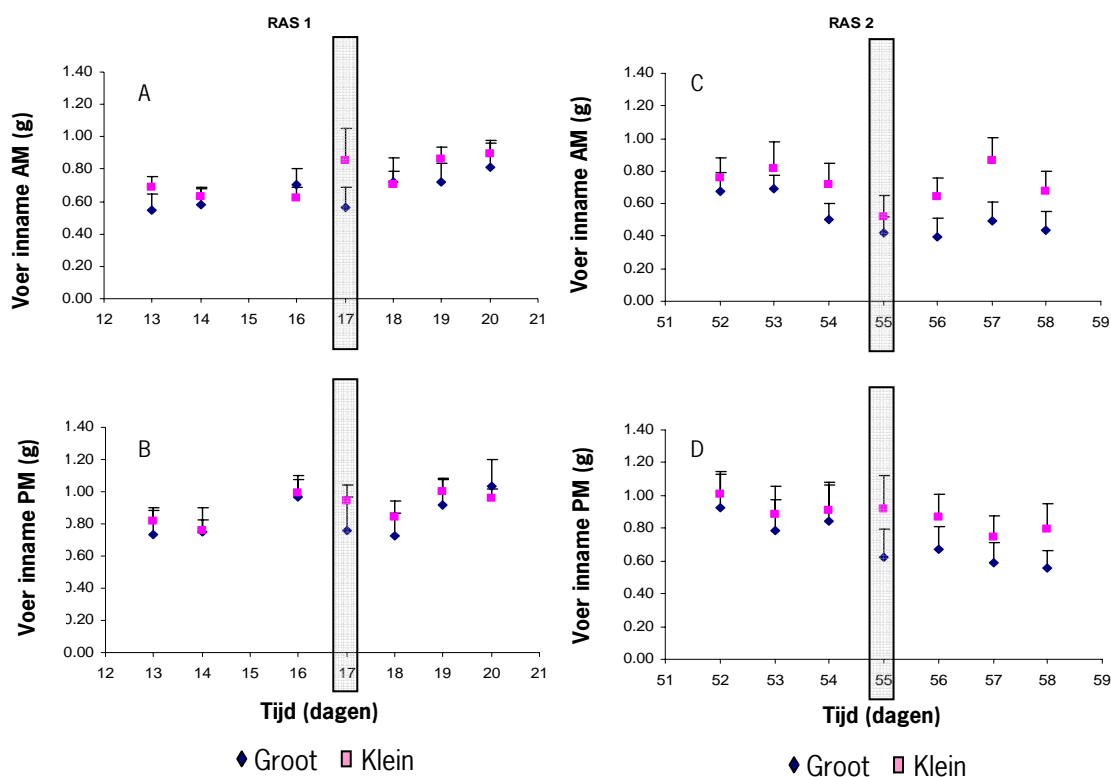
### 5.2 Materiaal en Methoden

Twee identieke RAS (RAS 1 en RAS 2) werden gebruikt, draaiend op 30L/kg voer (HOGE accumulatie RAS). De RAS bevatten 4 tanks van 450 L met Nijl Tilapia, *Oreochromis niloticus*. De aantallen vissen per tank varieerden tussen 67 en 75 vissen. Twee tanks bevatten vissen van  $\pm 60$  g (klein) en de andere twee vissen van  $\pm 300$  g (groot). Het inlaatwater voor deze tanks werd gedeeld met het inlaatwater van 24 tanks van 40 L (12 met KLEINE en 12 met GROTE vissen) die individueel gehuisveste tilapia bevatten. De groepsgehuisveste vissen werden uitsluitend gevoerd met een automatische voederband, terwijl de individueel gehuisveste vissen handmatig, twee maal daags, *ad libitum* gevoerd werden. De vissen werden gevoerd met een commercieel voer (drijvende pellets, 3mm, 44% eiwit, Skretting, France). De totale experimentele periode duurde 58 dagen. Op dag 17 en 55 werd 's ochtends voor de voedersessie acute stress toegediend aan de groepsgewijs gehuisveste vissen in respectievelijk RAS 1 en 2. De stressopwekker bestond uit het verlagen van het waterniveau van de tank tot 1/3 van het normale niveau, gevolgd door het vangen van de vissen met een net waarna ze verzameld werden in een grote watertank. Nadat alle vissen gevangen waren werden ze terug in de tank gedaan samen met het verwijderde water. Deze stressopwekking werd achtereenvolgens bij alle 4 de tanks uitgevoerd. Gedurende de stressinductie werd de waterinlaat naar de tanks met groepsgehuisveste vissen gesloten, deze werd heropend nadat in alle 4 de tanks de stress was opgewekt. Op deze wijze zouden eventuele stoffen die werden uitgescheiden tengevolge van de toegediende stressor op hetzelfde moment door het systeem gaan lopen. Dertig minuten nadat de kranen weer waren geopend werden de vissen in de individuele tanks, zoals altijd, gevoerd. De totale voerinnamemotivatie werd elke dag per individu bepaald. Drie dagen voor en nadat de stress was opgewekt werd de voerinnamemotivatie in de ochtend (AM) en de middag (PM) en de voerinnamemotivatie bepaald. Voerinnamemotivatie werd bepaald als de latentie voor voerinnamemotivatie, ofwel de tijd die elk individu nam om de eerste pellet te consumeren. Voor data-analyse werd een herhaalde metingen ANOVA gebruikt om de voerinnamemotivatie te vergelijken tussen de 3 dagen voor, de dag van en de drie dagen na de toediening van de stressor.

### 5.3 Resultaten

Voerinnamemotivatie van grote en kleine vissen werd niet significant beïnvloed door de stress die werd opgewekt in RAS 1 op dag 17. Kleine vissen in RAS 2 vertoonden significant lagere voerinnamemotivatie op de ochtend van de dag waarop de stressor werd toegediend (dag 55) in vergelijking met dag 52 en 53. De daling in

voerinname was echter al bezig op de dag voor de stress (Figuur 5.1 – C). De voerinname-motivatie vertoonde geen significante verschillen na de stress.



Figuur 5.1. Voedselinname (g) van grote en kleine individuen 3 dagen voordat en nadat de stressor was toegediend aan de kweekvis (toediening stressor in RAS 1 is op dag 17; toediening stressor in RAS 2 is op dag 55).

#### 5.4 Discussie

De resultaten toonden aan dat vissen die water kregen van gestresste vissen hun voerinname en voerinname-motivatie niet veranderden. Het gebrek aan reactie van de individueel gehuisveste vissen kan komen door het feit dat het vrijgekomen cortisol van de gestresste vissen niet biologisch beschikbaar was voor niet-gestresste vissen (individueel gehuisveste vissen). Het aandeel vrije cortisol (en dus beschikbaar voor diffusie) kan ook te klein zijn geweest om een respons op te wekken. Een mogelijke reden voor een reductie van vrije cortisol in water zou de grote hoeveelheid humuszuren in het RAS kunnen zijn. Zoals gesuggereerd door Hubbard et al. (2002) kunnen steroïden gevangen raken op het oppervlak van humuszuren en daardoor niet beschikbaar zijn voor olfactorische detectie. Het is echter de vraag of humuszuren eenzelfde invangend effect hebben op cortisol en daardoor het cortisoltransport via passieve diffusie vanuit het water in de vis minimaliseren.

#### 5.5 Conclusies

Tilapia's die water ontvangen van gestresste vissen veranderen hun voerinname en voerinname-motivatie niet.



## 6. Het effect van recirculatie van kweekwater op productie, fysiologie en gedrag van tarbot

Edward Schram, Jan van der Heul, Hans van de Vis, Jeroen Jansen, Wout Abbink en Oliver Schneider  
Wageningen IMARES, Afdeling Aquacultuur.

### 6.1 Inleiding

In Europa wordt tarbot zowel in doorstroomsystemen als in recirculatiesystemen (RAS) gekweekt. Doorstroomsystemen worden vooral in Zuid Europa (Spanje) toegepast terwijl in Noord Europa, waaronder Nederland, kwekers zijn aangewezen op recirculatiesystemen. Dit heeft te maken met de beperkte beschikbaarheid van geschikt water en de beperkte mogelijkheid effluent te lozen. Op basis van ervaringen in de commerciële tarbotteelt lijkt het recirculeren van kweekwater te leiden tot een lagere groei dan in doorstroomsystemen. Dergelijke groeiremming in RAS is echter nooit vastgesteld onder gecontroleerde, experimentele omstandigheden. Ook zijn de effecten van het recirculeren van kweekwater op de fysiologie en het gedrag van vissen niet bekend.

Het huidige onderzoek had daarom als doel het vaststellen van de effecten van het recirculeren van kweekwater op de productie, de fysiologie en het gedrag van tarbot. Op basis van dit onderzoek verwachtten wij aan te kunnen tonen of groeiremming van tarbot daadwerkelijk optreedt in recirculatiesystemen. Daarnaast moet inzicht in de effecten op fysiologie en gedrag aanknopingspunten bieden voor vervolgonderzoek naar het voorkomen van groeiremming in RAS. Het onderzoek is uitgevoerd voor twee grootte klassen tarbot in drie verschillende kweeksystemen.

### 6.2 Materialen en methoden

#### *Experimentele systemen en behandelingen*

De experimentele behandelingen in dit onderzoek bestonden uit drie verschillende kweeksystemen met daarin twee grootteklassen tarbot. Het totaal aantal experimentele behandelingen komt daarmee op zes. De drie kweeksystemen waren een doorstroomstelsel en twee recirculatiesystemen, die verschilden in de mate waarin het kweekwater verversd werd.

De verversing van het kweekwater in de beide recirculatiesystemen bedroeg bij aanvang van het experiment 1.2% en 3.8% van het totale systeem volume per uur, overeenkomend met 1.4 m<sup>3</sup>/kg voer en 5.0 m<sup>3</sup>/kg voer. De systeemverversing in relatie tot de voergift (L/kg voer) varieerde gedurende het experiment als gevolg van verandering in de biomassa en de daaraan verbonden voergift. De voergift en de totale hoeveelheid verversingswater per systeem werden maandelijks vastgesteld, op basis waarvan de maandelijkse systeemverversing in relatie tot de voergift vastgesteld wordt. Toen op basis van tussentijdse resultaten bleek dat de experimentele behandelingen weinig effecten op de vissen leken te hebben, is de verversing van het meest gesloten recirculatiesysteem op dag 396 van het experiment verlaagd van 1.2% naar 0.3% van het systeem volume per uur met als doel de verschillen tussen de experimentele behandelingen te vergroten. De systeemverversing van de kweeksystemen wordt weergegeven in Fig. 6.1 (m<sup>3</sup>/kg voer) en Fig. 6.2 (% systeemvolume/uur). Voor de verversing van de recirculatiesystemen en de doorstroming van het doorstroomstelsel werd gebruik gemaakt van hetzelfde bronwater.

In dit rapport wordt met *Doorstroom* aan het doorstroomstelsel gerefereerd. Aan de recirculatiesystemen wordt gerefereerd als *RAS1%* en *RAS5%*, waarbij RAS staat voor *recirculating aquaculture system* en de percentages verwijzen naar de mate van systeemverversing.

Elk kweekstelsel bestond uit zes ronde tanks met een oppervlakte van 5.3 m<sup>2</sup>. In totaal bestond de experimentele opstelling uit 18 tanks. Elke tank werd afzonderlijk verlicht van 8:00 tot 20:00, resulterend in een daglengte van 12 uur.

De waterbehandeling van de recirculatiesystemen bestond uit een drumfilter, een biologisch filter en UV. Daarnaast werd elke tank belucht met pure zuurstof via een ceramische diffusor en was elke tank voorzien van een ontgassingkolom waarover het ingaande water stroomde voordat het de tank bereikte. Fig. 6.3 is een schematische weergave van de recirculatiesystemen. Fig. 6.4 geeft een schematische weergave van de experimentele systemen. Tabel 6.1 geeft een overzicht van de kenmerken van de drie experimentele systemen.

### *Vissen en voeding*

Bij aanvang van het experiment op 1 maart 2007 werden in elk systeem drie tanks bezet met grote tarbot (L,  $518 \pm 119$  g) en drie tanks met kleine tarbot (S,  $183 \pm 37$  g). De gemiddelde gewichten per grootteklasse waren gelijk voor de drie kweeksystemen (Two-way ANOVA,  $P = 0.99$ ). Binnen deze beide grootteklassen werden drie subklassen onderscheiden: *small* (S), *medium* (M) en *large* (L). Dit resulteerde in een totaal van zes grootteklassen aangeduid als SS, SM, SL, LS, LM, LL, waarbij de eerste letter de hoofdklasse aangeeft en de tweede letter de subklasse. Per kweekstelsysteem werden deze zes grootteklassen afzonderlijk in een van de zes tanks gehuisvest.

Gedurende het experiment is tweemaal (mei 2007 en januari 2008) een aantal vissen uit elke tank verwijderd om de bezettingsdichtheid niet te hoog op te laten lopen.

Dagelijks werden alle tanks driemaal (9:30, 13:30, 17:30) gedurende circa een half uur handmatig gevoerd tot visueel waargenomen verzadiging (Le Gouessant, Turbot Label Rouge). De voergift per tank werd op maand basis vastgesteld door het voerverbruik per tank te administreren. Het voerverlies werd niet gekwantificeerd maar door handmatige voeding tot een minimum beperkt.

Tabel 6.1. Kenmerken van de drie experimentele kweeksystemen.

Kenmerk	RAS 1%	RAS 5%	Doorstroom
Totaal systeemvolume (m <sup>3</sup> )	25.69	24.53	16.8
Tankvolume (m <sup>3</sup> )	2.75	3.00	2.80
Tankoppervlak (m <sup>2</sup> )	5.3	5.3	5.3
Debiet per tank (m <sup>3</sup> /uur)	2.27	3.00	2.24
Debiet per tank (tankvolume/uur)	1	1	0.8
Gemiddelde systeemverversing (m <sup>3</sup> /kg voer)	1.4	5.0	71
Gemiddelde systeemverversing (% of totaal volume/uur)	0.9	3.8	80
Volume biofilter (m <sup>3</sup> )	3.87	3.87	-
Drum filter maaswijdte (µm)	30	30	-
U.V. (W)	450	450	-

### *Looptijd*

Het experiment startte op 1 maart 2007 en liep tot 1 september 2008 en had daarmee een looptijd van 579 dagen.

### *Metingen en bemonsteringen*

#### *Productie*

De gewichtstoename van de vissen werd vastgesteld door maandelijks in elke tank een deel van het visbestand te wegen. Met een hek werd een tank in twee compartimenten ingedeeld, waarbij alle vissen bijeengedreven werden aan een kant van het hek. Vervolgens werden minimaal 50 vissen per tank uit de tank geschept, gewogen en teruggeplaatst aan de andere zijde van het hek om te voorkomen dat individuele vissen nogmaals gewogen werden. Eventuele dode vissen werden dagelijks uit de tanks verwijderd, gewogen en gedocumenteerd.

#### *Fysiologie*

Tijdens het experiment zijn op twee momenten de vissen bemonsterd op fysiologische parameters. De eerste bemonstering vond plaats op 13 november 2007 (dag 258). De tweede bemonstering vond plaats op 2 september 2008 (dag 552), 5 maanden nadat de verversing van het meest gesloten recirculatiesysteem verlaagd werd.

De fysiologische parameters betroffen conditiefactor, cortisol, glucose en lactaatgehalten in het bloedplasma, hematocriet, leucocriet en miltgewicht. Het gewicht van de kopnier is niet vastgesteld omdat het intact verwijderen van de kopnier vrijwel onmogelijk was waardoor een nauwkeurig vaststellen van het gewicht niet mogelijk was.

Bij de eerste bemonstering werden 5 vissen per tank bemonsterd. Vanwege de grote individuele spreiding in de cortisolgehalten die in deze monsters werd waargenomen, is besloten om tijdens de tweede bemonstering het aantal bemonsterde vissen te verhogen naar 10 vissen per tank. Voor het overige was de hieronder beschreven werkwijze gelijk voor beide bemonsteringen.

Op de monsterdagen werden de vissen niet gevoerd. De te bemonsteren vissen werden per tank verzameld en verwerkt voordat de volgende tank bemonsterd werd. Per tank werden vijf vissen gelijktijdig met een net uit een tank geschept. Op de tweede monsterdag werd met twee netten tegelijk geschept om gelijktijdig 10 vissen te verzamelen. De vissen werden vervolgens met een harde klap op de schedel gedood.

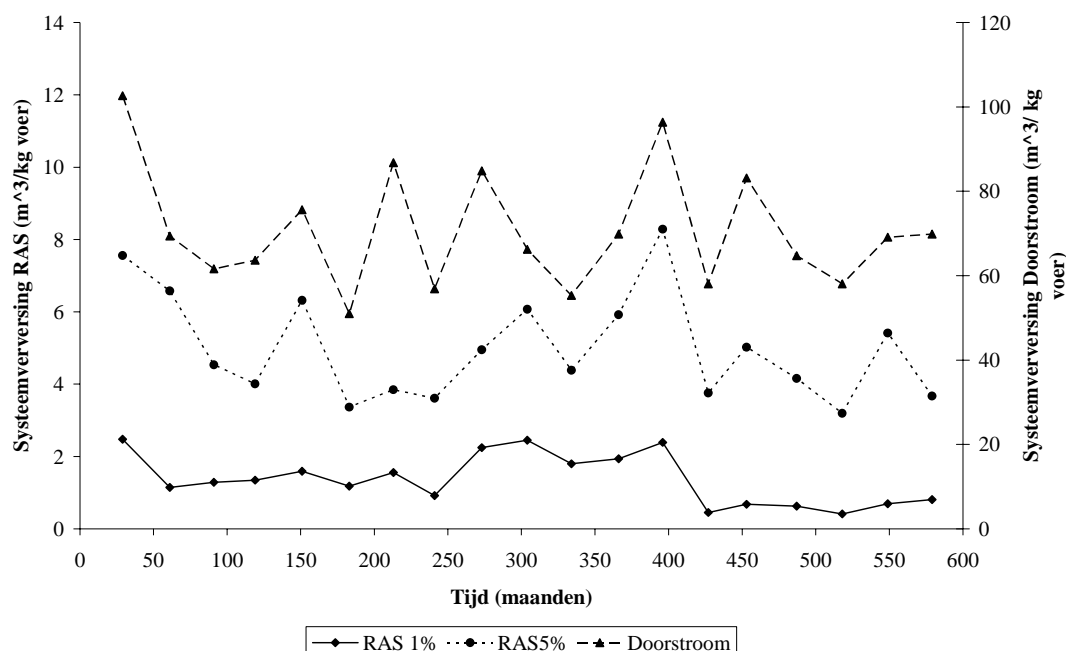


Fig. 6.1 De mate van vervanging van de experimentele kweeksystemen gedurende het experiment uitgedrukt in (m³/kg voer). De linker X-as betreft de twee recirculatiesystemen. De rechter X-as betreft het doorstroomstelsel.

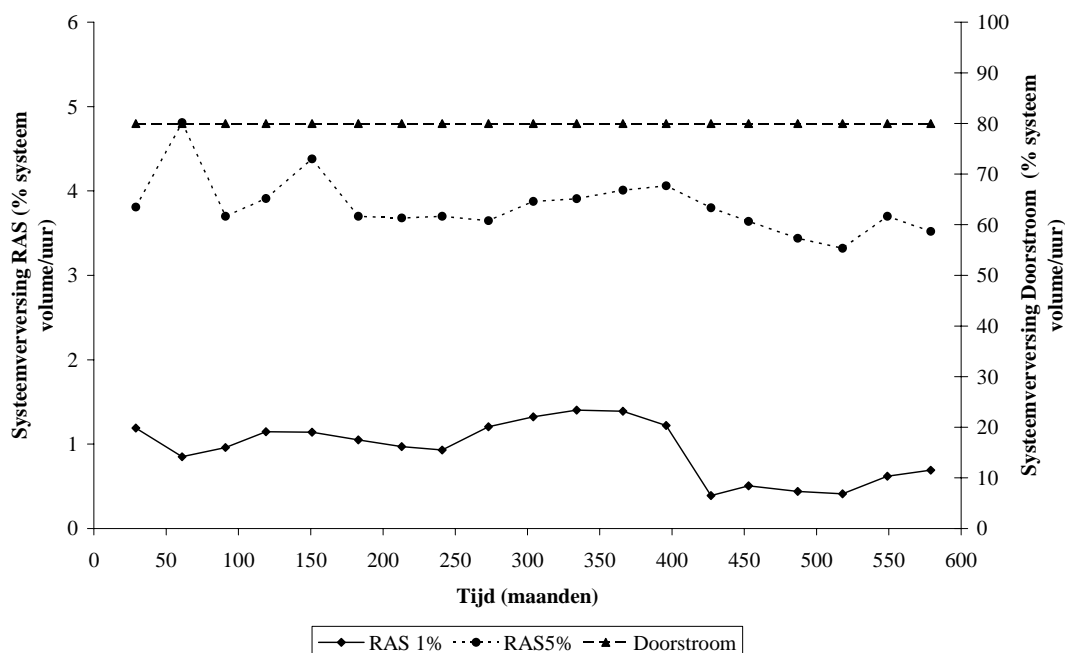


Fig. 6.2 De mate van vervanging van de experimentele kweeksystemen gedurende het experiment uitgedrukt in (% systeemvolume/uur). De linker X-as betreft de twee recirculatiesystemen. De rechter X-as betreft het doorstroomstelsel.

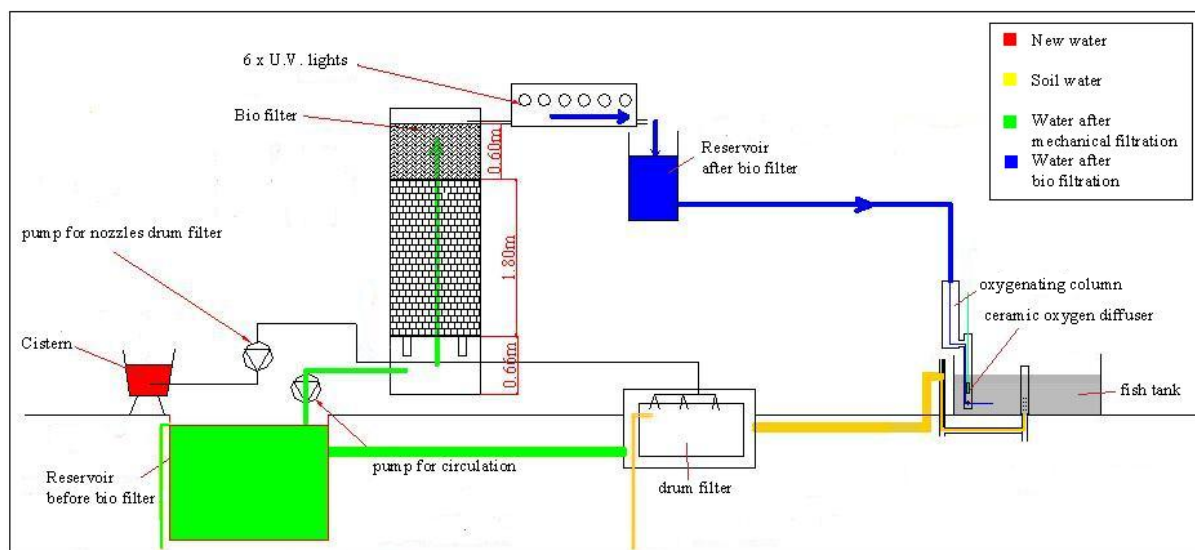


Fig. 6.3 Schematische weergave van het recirculatiesysteem.

Door de vissen met een enkele schep van het net uit de tank te verwijderen en daarna onmiddellijk te doden werd voorkomen dat het vangen van de vis ten behoeve van de bemonstering leidde tot een stress reactie die de daarop volgende metingen van met name cortisol beïnvloedde.

De bemonsterde vissen werden individueel gewogen en gemeten, gevolgd door het nemen van een bloedmonster van 1 ml met een gehepariniseerde injectienaald onder de wervelkolom bij de staart. Het bloedmonster werd vervolgens overgebracht in een eppendorf cupje. Zodra alle bloedmonsters per tank verzameld waren, werden de bloedcellen van het bloedplasma gescheiden door de monsters circa 8 minuten te centrifugeren op 10.000 toeren/min. In de tijd tussen het verzamelen en centrifugeren werden de bloedmonsters op scherfjes bewaard. Na centrifugeren werd het bloedplasma verwijderd met een automatische pipet en gelijk verdeeld over drie eppendorf cupjes ten behoeve van de cortisol, glucose en lactaat analyses. De plasmamonsters werden op locatie en tijdens transport tijdelijk opgeslagen op droogijs (-80°C) en daarna in de vriezer op -70°C voorafgaand aan de analyses.

Hematocriet werd per vis in duplo bepaald. Hematocrietcapillairen werden gevuld met bloed door deze vlak na verzameling in de eppendorf met het bloedmonster te plaatsen, waarna ze afdicht werden met wax en gedurende 3 minuten werden gecentrifugeerd bij 10.000 toeren/min. De hoogte van de bloedcellen en totale hoogte van de inhoud van de capillairen (plasma en bloedcellen) werd gemeten met een digitale schuifmaat op 0.1 mm nauwkeurig. De hoeveelheid witte bloedcellen was in alle gevallen te klein om een nauwkeurige meting van de hoogte van de kolom te kunnen verrichten, waardoor geen leucocriet gegevens verzameld konden worden. Het miltgewicht werd bepaald door deze uit de vis te verwijderen en te wegen.

Cortisol is gemeten met behulp van RIA (radio-immuno-assay) (MP-biomedicals) en glucose is gemeten op de VETTEST 8008 dry chemistry analyser, beiden door de universiteit van Leuven, België.

### Gedrag

Het effect van de experimentele behandelingen op gedrag is vastgesteld door directe observaties en met behulp van video-opnames gevolgd door analyse van de opgenomen beelden.

Voor het maken van video-opnames is boven elke tank een camera opgehangen (CCTV system), gekoppeld aan twee digitale videorecorders (Sanyo DSR3716P) met negen camera's per recorder. De videocamera's brachten niet de gehele tank in beeld maar doordat de afstand van de camera tot het wateroppervlak gelijk was voor elke tank, is van elke tank een gelijke fractie in beeld gebracht. Opnames werden gemaakt op 9 dagen in de periode 15 tot en met 31 oktober 2007. Opnames werden gemaakt tussen voerbeurten in, van 11:00 tot 11:10 om het zwemgedrag vast te leggen.

Het zwemgedrag is gemeten door op de video-opnames de zwembewegingen in een tank gedurende 10 minuten te tellen, waarbij elke verplaatsing groter dan de lichaamslengte als zwembeweging werd gedefinieerd. Omdat het aantal vissen niet gelijk was in elke tank is per tank het aantal waargenomen zwembewegingen gerelateerd aan het aantal vissen in de tank. In een aantal gevallen bleek het niet mogelijk om de zwemactiviteit nauwkeurig vast te stellen door dat schuin op het wateroppervlak het zicht belemmerde. Deze metingen zijn

buitenbeschouwing gelaten en uiteindelijk bleken van de negen opnamedagen voor de kleine vis 6 dagen en voor de grote vis 8 dagen geschikt voor analyse. Voeropnamegedrag is gemeten als *Latency to feed intake*, de tijd tussen het op het water vallen van de eerste voerpellet van een voerbeurt en het ophappen van de eerste pellet door een vis. De *Latency to feed intake* is handmatig met een stopwatch gemeten. De handmatige metingen werden verricht op 20 dagen in de periode 11 februari tot en met 20 mei 2008.

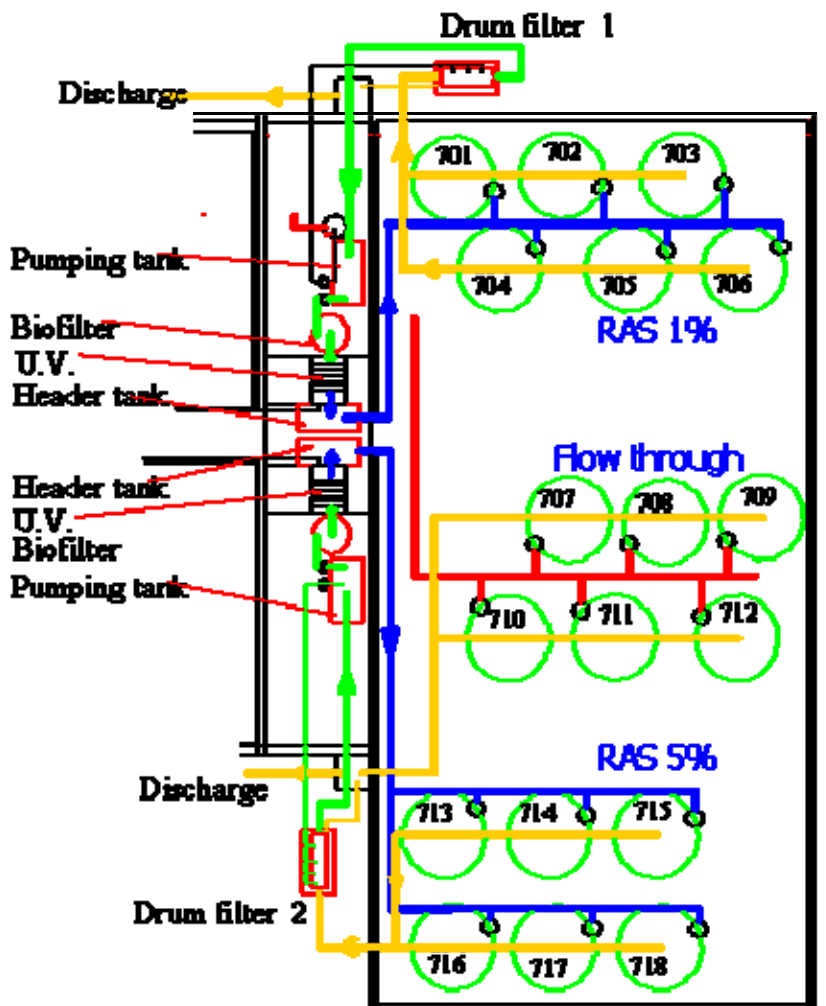


Fig. 6.4 Schematische weergave van de experimentele opstelling.

#### Waterkwaliteit

De waterkwaliteit werd gemeten om de experimentele omstandigheden te bewaken en om het effect van kweekstelsel op waterkwaliteit vast te stellen.

Zuurstof (Oxyguard Handy Gamma) en watertemperatuur (Hach Lange HQ 40D) werden op werkdagen in elke tank gemeten. De pH (Hach Lange HQ 40D) en de concentraties van totaal ammoniak stikstof (TAN) (fotometrisch) en nitriet (fotometrisch) werden driemaal per maand gemeten op systeem niveau.

## Data analyse en statistiek

### Groei en voeropname

Groei is geëvalueerd als gewichtsverandering in de tijd. Voeropname is geëvalueerd als voeropname in de tijd, uitgedrukt als de hoeveelheid voer verstrekt per kg vis per dag.

Het individuele gemiddelde visgewicht in een bepaalde maand is berekend als het gemiddelde van het individuele visgewicht aan het begin van de maand en aan het einde van de maand. De groeidata zijn geanalyseerd met *Generalized least estimates (GLS)* in R2.7.0 (R foundation, 2007/2008). Met deze benadering konden veranderingen in de tijd tussen tanks en systemen vergeleken worden. Het toegepaste model zag er als volgt uit:

Model=glsl(weight ~ factor(system) \* days + factor(size) + RRkg + temp + correlation=corAR1(form=~1))

Responsvariabelen waren het gemiddelde individuele gewicht of de voeropname. Factoren in het model betroffen de monsterdagen (*days*), grootte van de vis (*size*), systeemversing (*RRkg*), watertemperatuur (*temp*).

Daarnaast bevatte het model een term waarmee gecorrigeerd werd voor autocorrelatie (*corAR1*).

De grootteklassen in de analyse betroffen in de eerste plaats de kleine (S) en de grote (L) tarbotten (3 tanks per klasse per kweekstelsel) en daarna de drie subklassen per grootteklasse (1 tank per subklasse per kweekstelsel). Wanneer de grootteklassen onderling vergeleken werden, werd de grootteklasse als factor uit het model verwijderd. De systeemversing werd uitgedrukt als L/kg voer/dag. De watertemperatuur betrof het maandelijkse gemiddelde.

Wanneer een van de factoren in het model niet significant bleek ( $P > 0.05$ ), werd deze factor uit het model verwijderd en het gereduceerde model werd opnieuw gedraaid.

In totaal werden drie datasets geanalyseerd: de gehele experimentele periode (dag 1 – 579), de periode voordat de verversing van RAS1% werd verlaagd (dag 1-396) en de periode nadat de systeemversing van RAS1% werd verlaagd (dag 397-579). Daarnaast werden alle zes de grootteklassen getoetst op significante verschillen tussen kweeksystemen.

De gemiddelde gewichten per systeem aan het begin en aan het einde van het experiment zijn getoetst op verschillen tussen kweeksystemen en grootteklassen met *Two-way ANOVA*. De specifieke groeisnelheid (SGR) over de gehele experimentele periode is berekend per tank als:

$$\text{SGR (\%/dag)} = (\ln(W_t) - \ln(W_0)) * 100/T$$

Waarin  $W_t$  en  $W_0$  het gemiddelde individuele gewicht (g) per tank aan het einde en het begin van de experimentele periode waren en  $T$  de lengte van de experimentele periode in dagen. SGR is getoetst op verschillen tussen kweeksystemen en grootteklassen met *Two-way ANOVA*.

### Fysiologie

De fysiologische parameters betroffen metingen op individu niveau, de gemiddelden daarvan vormden de meetwaarde per tank. Bij de statistische analyse van de metingen werden deze waarden per tank beschouwd aangezien niet de individuele vis maar de tank de experimentele eenheid was in dit experiment.

Fysiologische parameters werden in eerste instantie getoetst op verschillen als gevolg van de kweeksystemen en de grootteklassen (L en S) met *Two-way ANOVA*. Vervolgens werden de fysiologische parameters afzonderlijk voor de grote en de kleine tarbotten met *One-way ANOVA* getoetst op verschillen tussen kweeksystemen.

De fysiologische parameters gemeten op de beide monsterdagen werden per grootte klasse getoetst op verschillen tussen monsterdagen met *One-way ANOVA*. Vervolgens werd per grootte klasse getoetst of de fysiologische parameters voor de afzonderlijke kweeksystemen verschilden tussen monsterdagen met *One way ANOVA*.

De conditiefactor relateert als volgt het gewicht (g) aan de lengte (cm) van de vis:

$$\text{Conditiefactor} = 100 \times \frac{\text{Gewicht}}{\text{Lengte}^3}$$

Ten behoeve van de hematocriet bepaling is de hoogte van de bloedcellen en totale hoogte van de inhoud van de capillairen gemeten. Het hematocriet gehalte volgt vervolgens uit:

$$\text{Hematocriet (\%)} = \frac{\text{Hoogte bloedcellen}}{(\text{Hoogte bloedcellen} + \text{hoogte bloedplasma})} \times 100\%$$

Het hematocrietgehalte per vis volgde uit het gemiddelde van de duplo metingen per vis. Het hematocriet gehalte per tank volgde uit het gemiddelde van de hematocrietgehalten van de vissen uit de tank.

Het miltgewicht is onafhankelijk gemaakt van de grootte van de vis door deze per individuele vis uit te drukken als percentage van het totale lichaamsgewicht: de miltindex.

#### *Gedrag*

De gemiddelde zwemactiviteit per behandeling werd gezamenlijk geanalyseerd voor de beide grote klassen middels *Two-way ANOVA* om effecten van behandelingen (kweeksystemen) en grote klasse vast te stellen. Vervolgens werd voor elke grote klasse per monsterpunt de zwemactiviteit getoetst op verschillen tussen behandelingen middels *One-way ANOVA*.

De gemiddelde reactiesnelheid op het voer (*latency to feed intake*) per behandeling werd gezamenlijk geanalyseerd voor de beide grote klassen middels *two-way ANOVA* op LOG getransformeerde data om effecten van behandelingen (kweeksystemen) en grote klasse vast te stellen. Vervolgens werd voor elke grote klasse per monsterpunt de zwemactiviteit getoetst op verschillen tussen behandelingen middels *One-way ANOVA*.

#### *Waterkwaliteit*

Op basis van de dagelijkse metingen in elke tank werd per tank een gemiddelde zuurstofverzadiging berekend voor elke maand in de experimentele periode (n = 20). Hieruit volgden maandgemiddelden per behandeling (kweekstelsysteem, n = 6) en maandgemiddelden per grootte klasse binnen behandelingen (n=3). De gemiddelde zuurstofverzadiging per behandeling voor het gehele experiment werd het gemiddelde van de maandgemiddelden per behandeling (n = 19). De gemiddelde zuurstofverzadiging per behandeling voor de gehele experimentele periode werd gezamenlijk geanalyseerd voor beide grote klassen middels *Two-way ANOVA* om effecten van behandelingen (kweeksystemen) en grote klasse vast te stellen. Vervolgens werd de gemiddelde zuurstofverzadiging per kweekstelsysteem per monsterdag met *Repeated measurements ANOVA* voor elke afzonderlijke monsterdag getoetst op verschillen tussen behandelingen.

De watertemperatuur werd dagelijks gemeten op systeemniveau. Hieruit volgden gemiddelde meetwaarden per maand (n = 20) en vervolgens een gemiddelde waarde voor het gehele experiment (n = 19).

De pH en de concentraties van totaal ammonia stikstof (TAN) en nitriet werden driemaal per maand gemeten op systeemniveau. Hieruit volgden gemiddelde meetwaarden per maand (n=3) en vervolgens een gemiddelde waarde voor het gehele experiment (n = 19). Omdat de kweeksystemen niet herhaald werden, konden verschillen in meetwaarden van deze waterkwaliteitsparameters niet op significantie getoetst worden.

## 6.3 Resultaten

### Groei en voeropname

De ontwikkeling van het gemiddelde gewicht tijdens het experiment wordt weergegeven in Fig. 6.5. voor de grote vis en in Fig. 6.6 voor de kleine vis. De begin- en eindgewichten en de bijbehorende specifieke groeisnelheid (SGR) worden weergegeven in Tabel 6.2. Een effect van kweeksystemen op groei van tarbot kon in geen van de geanalyseerde datasets worden waargenomen (Tabel 6.3). De P-waarden van de verschillende componenten van het GLS model worden voor de gemodelleerde datasets weergegeven in Tabel 6.3. De significante interacties tussen kweeksystemen en dagen ( $RAS1\% * d$  en  $RAS5\% * d$ ) geven aan dat er een groot effect was van de monsternamen op de ontwikkeling van het gemiddelde gewicht in de tijd, en dit maskeert mogelijk een effect van het kweekstelsel op groei. Voor twee grootte klassen (SL en LS) werd wel een significant effect van kweekstelsel op groei waargenomen, maar dit effect is klein en wordt teniet gedaan door het ontbreken van een *overall* effect van kweeksystemen op groei. Daarnaast is het waargenomen verschil het meest prominent in het minst gesloten recirculatiesysteem, terwijl een effect van kweeksystemen juist het meest prominent aanwezig zou moeten zijn in een van de extreme behandelingen, hetzij het doorstroomsysteem, hetzij het meest gesloten recirculatiesysteem. Watertemperatuur had een veel groter effect op groei, maar ook ten aanzien van het effect van watertemperatuur kunnen geen definitieve conclusies getrokken worden omdat in een aantal modellen watertemperatuur geen significante factor bleek te zijn.

Als er een effect was van de mate van verversing van het kweekstelsel op de groei van tarbot, dan was dat effect dermate klein dat het in het huidige experiment als gevolg van andere factoren die ook invloed uitoefenen op de groei, niet kon worden waargenomen.

Het ontbreken van een effect van kweeksystemen op de groei van tarbot blijkt ook uit de specifieke groeisnelheid (SGR) berekend over de gehele experimentele periode en de gewichten die aan het einde van het experiment in de verschillende kweeksystemen werden bereikt ( $W_t$ ). De SGR verschilde niet tussen kweeksystemen ( $P = 0.27$ ) maar wel tussen grootteklassen ( $P < 0.001$ ).  $W_t$  verschilde ook niet tussen kweeksystemen ( $P = 0.20$ ) maar wel tussen grootteklassen ( $P < 0.05$ ).

Tabel 6.2. Gemiddelde (SD) begin en eindgewichten voor de zes grootte klassen per kweekstelsel en de bijbehorende specifieke groeisnelheid (SGR)

Systeem	Grootte klasse	Sub klasse	Begingewicht (g)	Eindgewicht (g)	SGR (%/d)
RAS 1%	L	S	375	1323	0.21
		M	507	1490	0.18
		L	659	1727	0.16
	S	S	143	1140	0.34
		M	184	1353	0.33
		L	229	1730	0.33
Doorstroom	L	S	384	1512	0.22
		M	504	2114	0.23
		L	654	2115	0.19
	S	S	146	1354	0.37
		M	175	1577	0.36
		L	227	1535	0.31
RAS 5%	L	S	401	1706	0.24
		M	513	1778	0.20
		L	669	1846	0.17
	S	S	138	1295	0.37
		M	179	1472	0.35
		L	226	1526	0.31



Tabel 6.3. P-waarden van de componenten van de GLS modellen waarmee groei en voeropname getoetst zijn op verschillen tussen de recirculatiesystemen ten opzichte van het doorstroom systeem voor de verschillende perioden (dag 0-549, dag 0-396 en dag 396-549) en grootte klassen. RRkg is systeem water verversing (l/kg voer), Temp is temperatuur (gemiddelde per maand) en RAS1%\*d en RAS5%\*d de interactie tussen systeem en monsterdag.

	Intercept	RAS 1%	RAS 5%	Dagen	RRkg	Temp	RAS 1%*d	RAS 5%*d
Geteste dataset	P-waarden							
<b>Groei</b>								
Dag 0-549	0.000	0.489	0.232	0.000	n.a.	0.000	0.000	0.056
Dag 0-396	0.018	0.855	0.962	0.000	n.a.	n.a.	0.000	0.000
Dag 396-549	0.000	0.729	0.402	0.000	n.a.	n.a.	0.065	0.874
SS	0.174	0.848	0.130	0.000	n.a.	n.a.	0.000	0.000
SM	0.000	0.824	0.660	0.000	n.a.	0.000	0.000	0.003
SL	0.000	0.035	0.006	0.000	n.a.	0.001	0.639	0.612
LS	0.240	0.100	0.028	0.000	n.a.	0.000	0.000	0.435
LM	0.000	0.945	0.751	0.000	n.a.	n.a.	0.000	0.000
LL	0.000	0.079	0.083	0.000	n.a.	n.a.	0.000	0.002
<b>Voeropname</b>								
Dag 0-549	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.373	0.945
Dag 0-396	0.004	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.715	0.434
Dag 396-549	0.013	0.032	0.084	0.440	0.033	n.a.	0.080	0.255
SS	0.002	0.006	0.018	0.017	0.001	0.006	0.947	0.994
SM	0.229	0.050	0.050	0.027	0.040	0.000	0.104	0.700
SL	0.396	0.071	0.406	0.094	n.a.	0.011	0.778	0.432
LS	0.609	0.001	0.325	0.224	n.a.	0.010	0.003	0.029
LM	0.000	0.006	0.001	0.001	0.003	0.038	0.717	0.192
LL	0.013	0.028	0.031	0.011	0.005	0.000	0.437	0.505

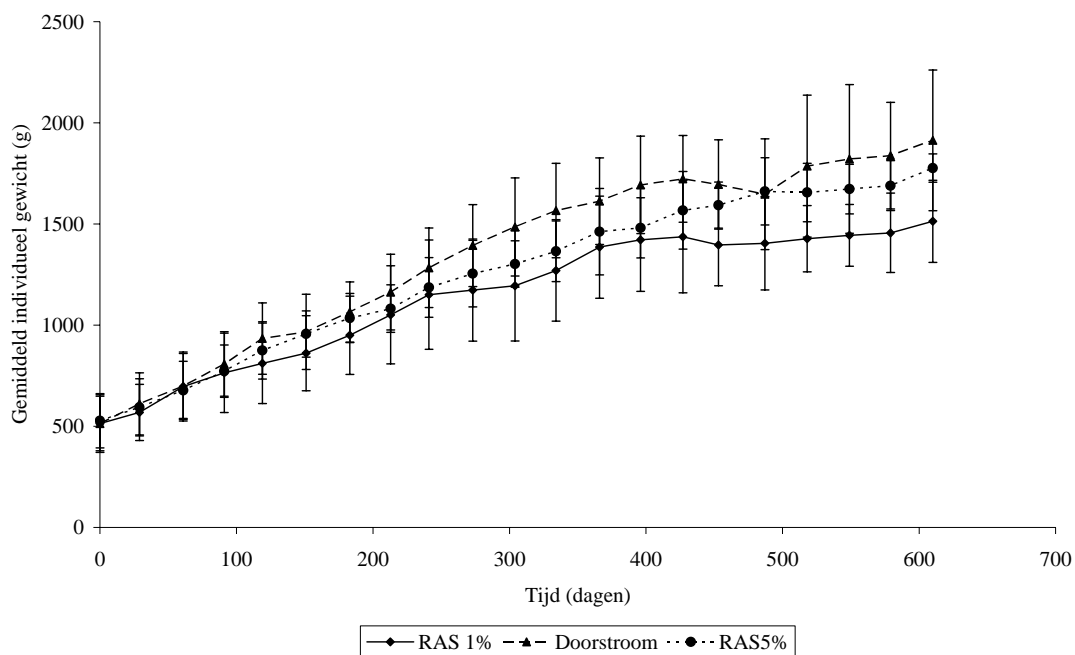


Fig. 6.5. Gemiddeld individueel visgewicht van de grote tarbot (L) tijdens de experimentele periode voor de drie kweeksystemen.

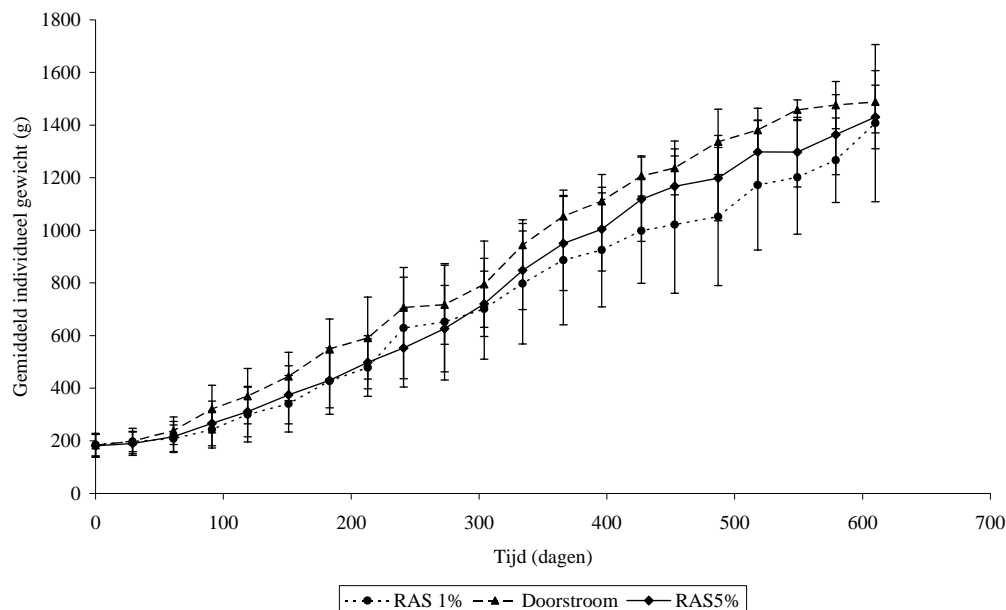


Fig. 6.6. Gemiddeld individueel visgewicht van de kleine tarbot (S) tijdens de experimentele periode voor de drie kweeksystemen.

Voor voeropname werd wel een effect van kweeksystemen vastgesteld. Uit het statistische model volgt dat de voeropname in de beide recirculatiesystemen lager is dan in het doorstroomstelsel (Tabel 6.4). Het systeemeffect op voeropname blijkt uit de afzonderlijke effecten op voeropname voor de verschillende grootte klassen (Tabel 6.3). In tegenstelling tot de groeieresultaten, had de monsternamen geen groot effect op de ontwikkeling van de voeropname in de tijd.

Tabel 6.4. Gemiddelde (SD) voeropname (g/kg/dag) voor de gehele experimentele periode voor de zes grootte klassen.

	LS	LM	LL	SS	SM	SL
Doorstroom	3.79 (1.22)	3.81 (1.12)	4.28 (1.21)	3.95 (1.22)	3.59 (1.07)	4.31 (1.46)
RAS 5%	3.48 (1.25)	3.58 (0.97)	4.40 (1.78)	4.65 (1.61)	3.88 (1.18)	4.51 (1.54)
RAS 1%	4.47 (1.83)	3.77 (1.31)	4.19 (1.54)	3.93 (1.02)	4.31 (1.34)	3.61 (1.32)

#### *Fysiologische en immunologische parameters*

De fysiologische en immunologische parameters werden in alle tanks gemeten op dag 258 en dag 552 van de experimentele periode. Ten tijde van de eerste monsterdag (dag 258) bedroeg de gemiddelde systeemverversing van het meest gesloten recirculatie systeem (RAS1%) 1700L/kg voer. De systeemverversing van RAS1% werd op dag 396 van de experimentele periode verlaagd naar 610L/kg voer. Ten tijde van de tweede bemonstering waren de vissen in het experiment 156 dagen blootgesteld aan deze verlaagde systeemverversing.

#### *Hematocriet en Leucocriet*

Meetbaar leucocriet is op geen van de beide monsterdagen waargenomen.

Hematocriet gemeten tijdens de eerste bemonstering verschilde niet tussen de kweeksystemen (Tabel 6.5). Ook binnen de grootteklassen verschilde hematocriet niet tussen de kweeksystemen (Tabel 6.6). Wel werd, los van de kweeksystemen, een hogere gemiddelde hematocriet gemeten voor de kleine tarbot (*Two way ANOVA*,  $P < 0.05$ , Tabel 6.5).

Tijdens de tweede bemonstering werd wel een effect van het kweekstelsel op hematocriet waargenomen: in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) was deze hoger dan in de twee andere kweeksystemen (*Two way ANOVA*,  $P < 0.10$ , Tabel 6.5). Echter voor de beide grootte klassen afzonderlijk werd geen effect van het kweekstelsel vastgesteld (Tabel 6.6).

Het effect van grootteklasse op hematocriet gemeten tijdens de tweede bemonstering was omgekeerd aan het effect gemeten tijdens de eerste bemonstering: nu werd een hogere hematocriet vastgesteld voor de grote tarbot (Tabel 6.5). Hematocriet van de kleine vis was lager op de tweede monsterdag dan op de eerste monsterdag (*One way ANOVA*,  $P < 0.001$ , Tabel 6.6), terwijl de gemiddelde hematocriet voor de grote vis gelijk is voor beide monsterdagen. Hierdoor is het effect van grootteklasse op hematocriet verschillend voor de beide monsterdagen: op de eerste monsterdag werd een hoger hematocriet gemeten in de kleine vis, terwijl op de tweede monsterdag hematocriet het hoogst was in de grote tarbot. De hematocrietwaarden in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) zijn gelijk voor de kleine vis op de beide monsterdagen. Voor de grote vis werd een trend waargenomen in de richting van een hogere hematocrietwaarde op de tweede monsterdag (*One way ANOVA*,  $P = 0.08$ , Tabel 6.6).

#### *Miltindex*

De miltindex gemeten tijdens de eerste bemonstering was het laagst in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) en gelijk aan elkaar in de andere twee kweeksystemen (Tabel 6.5). Tussen de beide grootte klassen en los van de kweeksystemen verschilde de miltindex niet (Tabel 6.6). Binnen de grootte klassen werd wel een verschil in miltindex waargenomen. De kleine vissen hadden een lagere miltindex in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS 5%) in vergelijking met het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) (*One way ANOVA*,  $P < 0.05$ , Tabel 6.6). De miltindex van de kleine vissen in het doorstroomsysteem verschilde niet van de twee andere kweeksystemen (Tabel 6.6). Bij de grote vissen werd geen effect van kweekstelsel op miltindex waargenomen.

De resultaten van de tweede monsterdag laten een min of meer omgekeerd beeld zien. De miltindex gemeten tijdens de tweede bemonstering was, in tegenstelling tot de eerste monsterdag, juist het hoogst in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) (*Two way ANOVA*,  $P < 0.05$ , Tabel 6.5). Daarnaast werd geen verschil in miltindex waargenomen onder de kleine vissen en juist een trend (*One way ANOVA*,  $P < 0.10$ , Tabel 6.6) in de richting van een grotere miltindex onder de grote vissen in het doorstroomsysteem.

Gemiddeld werden op de tweede monsterdag grotere miltindices gemeten voor de grote en de kleine vissen dan op de eerste monsterdag (*One-way ANOVA*,  $P < 0.001$  en  $P = 0.04$ , Tabel 6.6). Voor de kleine tarbot had het verlagen van de verversing van het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) geen effect op de miltindex. Voor de grote tarbot werden hogere (*One way ANOVA*,  $P = 0.02$ , Tabel 6.6) miltindices waargenomen op de tweede monsterdag.

#### *Glucose*

De gemeten glucosegehalten in het bloedplasma worden voor beide monsterdagen weergegeven in Tabel 6.5. Op de eerste monsterdag werd een lager gemiddeld glucosegehalte in het bloedplasma waargenomen voor beide grootte klassen in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) (*Two way ANOVA*,  $P < 0.05$ , Tabel 6.5). Binnen de grootte klassen was het glucosegehalte het laagst in de grote vis in RAS1%, terwijl voor de kleine vis zowel in het doorstroomsysteem als in het RAS1% lagere waarden gemeten werden dan in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) (Tabel 6.6).

Op de tweede monsterdag werden geen verschillen in het glucosegehalte van het bloedplasma gevonden tussen kweeksystemen en grootteklassen (Tabel 6.5).

#### *Cortisol*

De gemiddelde cortisolconcentraties in het bloedplasma per behandeling vertoonden een grote spreiding als gevolg van de onderliggende grote individuele variatie. Verschillen in cortisolgehalten tussen kweeksystemen en grootteklassen werden op geen van beide monsterdagen waargenomen (Tabel 6.5).

#### *Lactaat*

In alle bloedplasmamonsters was het lactaatgehalte lager dan 0.50 mmol/L.

#### *Conditiefactor*

Tijdens de eerste bemonstering werd geen effect van het kweekstelsel op de conditiefactor waargenomen (*Two way ANOVA*,  $P > 0.05$ , Tabel 6.5). Wel werd, los van de kweeksystemen, een hogere conditiefactor waargenomen in de grote vis (*Two way ANOVA*,  $P = 0.03$ , Tabel 6.5). Tijdens de tweede bemonstering werd wel een effect van het kweekstelsel op de conditiefactor waargenomen: de conditiefactor was hoger in het doorstroomsysteem dan in de beide recirculatiesystemen, die onderling niet van elkaar verschilden (*Two way ANOVA*,  $P < 0.01$ , Tabel 6.5), zowel voor de kleine vis

Tabel 6.5. Fysiologische parameters gemeten op dag 258 (eerste monsterdag) en dag 552 (tweede monsterdag) van het experiment. Weergegeven worden gemiddelde (SD) meetwaarden per kweekstelsel (n = 6 tanks/stelsel, n = 5 vissen/tank voor de eerste monsterdag, n = 10 vissen/tank voor de tweede monsterdag) en per grootteklasse (n = 9 tanks/grootte klasse, n = 5 vissen/tank voor de eerste monsterdag, n = 10 vissen/tank voor de tweede monsterdag). Meetwaarden voor fysiologische parameters gemarkeerd met verschillende letters zijn verschillend tussen kweeksystemen of grootteklassen. P-waarden zijn het resultaat van *Two-way ANOVA* met stelsel en grootteklasse als factoren. Least significant differences (LSD) worden alleen weergegeven indien verschillen significant zijn.

	<b>Hematocriet</b> (%)	<b>Miltindex</b> (%)	<b>Cortisol</b> (ng/ml)	<b>Glucose</b> (mmol/L)	<b>Conditiefactor</b>
<b>Eerste monsterdag (dag 258)</b>					
<b>Systeem</b>					
Doorstroom	21.0 (1.7)	0.13 (0.01) <sup>a</sup>	5.30 (8.6)	2.08 (0.32) <sup>a</sup>	1.78 (0.10)
RAS5%	20.2 (2.7)	0.10 (0.02) <sup>b</sup>	12.7 (13.6)	2.33 (0.15) <sup>a</sup>	1.76 (0.08)
RAS1%	19.4 (2.2)	0.13 (0.02) <sup>a</sup>	7.4 (8.3)	1.72 (0.21) <sup>b</sup>	1.76 (0.10)
<b>Grootteklasse</b>					
Klein	21.4 (1.3) <sup>a</sup>	0.12 (0.03)	12.5 (12.1)	2.02 (0.31)	1.72 (0.06) <sup>a</sup>
Groot	19.0 (2.4) <sup>b</sup>	0.11 (0.02)	4.4 (6.6)	2.06 (0.36)	1.81 (0.09) <sup>b</sup>
<b>P-waarden</b>					
Systeem	N.S.	0.029	N.S.	< 0.001	N.S.
Grootteklasse	0.012	N.S.	N.S.	N.S.	0.030
Systeem * Grootteklasse	N.S.	N.S.	N.S.	0.016	N.S.
<b>LSD. (5%)</b>					
Systeem	-	0.02	-	0.2185	-
Grootteklasse	0.017	-	-	-	0.079
Systeem * Grootte klasse	-	-	-	0.3090	-
<b>Tweede monsterdag (dag 552)</b>					
<b>Systeem</b>					
Doorstroom	18.9 (0.9) <sup>a</sup>	0.14 (0.02) <sup>a</sup>	2.76 (2.8)	1.82 (0.17)	1.90 (0.08) <sup>a</sup>
RAS5%	18.1 (1.0) <sup>a</sup>	0.17 (0.02) <sup>b</sup>	3.42 (4.9)	1.88 (0.17)	1.80 (0.08) <sup>b</sup>
RAS1%	19.7 (1.4) <sup>b</sup>	0.15 (0.02) <sup>ab</sup>	0.91 (1.2)	1.78 (0.15)	1.76 (0.07) <sup>b</sup>
<b>Grootteklasse</b>					
Klein	18.4 (1.2) <sup>a</sup>	0.15 (0.03)	2.42 (2.6)	1.88 (0.18)	1.77 (0.06) <sup>a</sup>
Groot	19.4 (1.2) <sup>b</sup>	0.15 (0.02)	2.31 (4.0)	1.77 (0.12)	1.87 (0.10) <sup>b</sup>
<b>P-waarden</b>					
Systeem	0.07	0.10	N.S.	N.S.	< 0.01
Grootteklasse	0.10	N.S.	N.S.	N.S.	< 0.01
Systeem * Grootteklasse	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<b>L.S.D.</b>					
Systeem	(P<0.10)	(P<0.10)	-	-	(P < 0.05)
Grootteklasse	1.14	0.024	-	-	0.07
Systeem * Grootte klasse	0.93	-	-	-	0.06
	-	-	-	-	-

Tabel 6.6 Fysiologische parameters gemeten op dag 258 en dag 552 van het experiment. Weergegeven worden gemiddelde (SD) meetwaarden per grootte klasse per kweekstelsysteem (n = 3 tanks/systeem, n = 5 vissen/tank voor de eerste monsterdag, n = 10 vissen/tank voor de tweede monsterdag). Meetwaarden voor fysiologische parameters gemarkeerd met verschillende letters verschillen tussen kweeksystemen op de betreffende monsterdag. P-waarden voor de afzonderlijke monsterdagen zijn het resultaat van *One-way ANOVA* met systeem als factor. P-waarden voor verschillen binnen systemen tussen de eerste en de tweede monsterdag zijn het resultaat van *Oneway ANOVA* met monsterdag als factor. P-waarden voor verschillen binnen grootte klassen tussen de eerste en tweede monsterdag zijn het resultaat van *Oneway ANOVA* met monsterdag als factor. Deze P-waarden geven per grootte klasse, en binnen de systemen per grootte klasse aan of de resultaten verschillen tussen de eerste en de tweede monsterdag.

Grootteklasse	Hematocriet (%)		Miltindex (%)		Cortisol (ng/ml)		Glucose (mmol/l)		Conditiefactor	
	Groot	Klein	Groot	Klein	Groot	Klein	Groot	Klein	Groot	Klein
<b>Eerste bemonstering (dag 258)</b>										
Doorstroom	21.2 (2.7)	20.9 (0.6)	0.12 (0.02)	0.13 (0.01) <sup>ab</sup>	0.3 (0.52)	10.3 (10.4)	2.30 (0.14) <sup>a</sup>	1.86 (0.17) <sup>a</sup>	1.86 (0.05)	1.70 (0.03)
RAS5%	18.3 (1.7)	22.1 (2.1)	0.11 (0.02)	0.10 (0.02) <sup>b</sup>	9.9 (9.8)	15.5 (18.6)	2.25 (0.15) <sup>a</sup>	2.40 (0.13) <sup>b</sup>	1.77 (0.09)	1.76 (0.08)
RAS1%	17.6 (1.4)	21.2 (0.7)	0.11 (0.01)	0.14 (0.02) <sup>a</sup>	2.9 (2.74)	11.8 (10.3)	1.64 (0.26) <sup>b</sup>	1.81 (0.16) <sup>a</sup>	1.81 (0.13)	1.71 (0.04)
P-waarde	0.14	0.54	0.34	0.05	0.20	0.89	0.01	< 0.01	0.53	0.35
<b>Tweede bemonstering (dag 552)</b>										
Doorstroom	19.3 (0.9)	18.4 (0.7)	0.13 (0.01)	0.15 (0.03)	2.63 (2.5)	2.90 (3.7)	1.90 (0.21)	1.74 (0.09)	1.96 (0.04) <sup>a</sup>	1.83 (0.06) <sup>a</sup>
RAS5%	18.5 (1.1)	17.7 (0.9)	0.16 (0.00)	0.18 (0.04)	3.10 (4.2)	3.73 (6.5)	1.93 (0.19)	1.84 (0.18)	1.87 (0.03) <sup>ab</sup>	1.74 (0.03) <sup>b</sup>
RAS1%	20.2 (1.3)	19.2 (1.5)	0.15 (0.02)	0.14 (0.02)	1.53 (1.4)	0.29 (0.5)	1.82 (0.21)	1.74 (0.08)	1.78 (0.10) <sup>b</sup>	1.74 (0.01) <sup>b</sup>
P-waarde	0.26	0.29	0.07	0.40	0.86	0.62	0.80	0.56	0.04	0.05
<b>P-waarden Eerste vs. Tweede monsterdag</b>										
<b>Grootte klasse</b>	0.72	< 0.001	< 0.001	0.04	0.42	0.03	0.23	0.04	0.23	0.10
<b>Systeem</b>										
- Doorstroom	0.32	0.01	0.53	0.46	0.19	0.31	0.05	0.32	0.05	0.03
- RAS5%	0.87	0.03	0.004	0.03	0.33	0.36	0.09	0.01	0.13	0.65
- RAS1%	0.08	0.10	0.02	0.90	0.46	0.19	0.41	0.56	0.70	0.52

#### *Conditiefactor (vervolg)*

als de grote vis. Net als op de eerste monsterdag werd op de tweede monsterdag een hogere conditiefactor waargenomen in de grote vis (*Two way ANOVA*,  $P < 0.01$ , Tabel 6.5).

De conditiefactor van zowel de grote als de kleine vis in het doorstroom systeem was hoger op de tweede monsterdag dan op de eerste monsterdag (*One way ANOVA*,  $P = 0.05$  en  $P = 0.03$ , Tabel 6.6). Voor de beide recirculatiesystemen werd dit verschil niet waargenomen. Het verlagen van de systeemverversing van RAS1% had dus geen effect op de conditiefactor.

#### *Gedrag*

##### *Zwemactiviteit*

Zwemactiviteit in een tank is uitgedrukt als het aantal zwembewegingen gedurende tien minuten, gedeeld door het aantal vissen in de tank. Zwemactiviteit is gedurende 10 minuten op acht monsterdagen vastgesteld. De video-opnames van de kleine vissen op monsterdagen 7 en 8 bleken niet bruikbaar omdat als gevolg van grote hoeveelheden schuim op het wateroppervlak de zwemactiviteit in een aantal tanks niet nauwkeurig kon worden vastgesteld.

De gemiddelde zwemactiviteit was lager in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) dan in het meer open recirculatiesysteem (RAS5%) en het doorstroomstelsel (*Two way ANOVA*,  $P = 0.007$ , Tabel 6.7). Daarnaast is er een trend ( $P < 0,10$ ) waargenomen die wijst in de richting van hogere gemiddelde zwemactiviteit bij grote tarbot (*Two way ANOVA*,  $P = 0.08$ , Tabel 6.7). Wanneer gekeken wordt naar de zwemactiviteit per grootte klasse dan verschilde de gemiddelde zwemactiviteit voor de zes monsterdagen van de kleine tarbot niet voor de drie kweeksystemen (Fig. 6.7). Wel bleek de zwemactiviteit van de kleine tarbot op de derde monsterdag hoger te zijn in het doorstroomstelsel dan in de twee recirculatiesystemen. Bij de grote tarbot is wel een effect van kweekstelsel op de zwemactiviteit waargenomen: de gemiddelde zwemactiviteit voor de acht monsterdagen was lager in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) dan in de twee andere kweeksystemen (Fig. 6.8). De zwemactiviteit per kweekstelsel verschilde niet op elke afzonderlijke monsterdag. Op de tweede monsterdag was de zwemactiviteit lager in het meest gesloten recirculatiesysteem dan in het meer open recirculatie stelsel en het doorstroomstelsel. Op de derde monsterdag was de zwemactiviteit in beide recirculatiesystemen lager dan in het doorstroomstelsel (Fig 6.8).

##### *Voeropnamegedrag*

Het voeropnamegedrag is gemeten als de reactiesnelheid op het aanbieden van het voer (*Latency to feed intake*). De gemiddelde *Latency to feed intake* was significant lager in het doorstroomstelsel (*Two way ANOVA*,  $P < 0.001$ , Tabel 6.7). Binnen het doorstroomstelsel werd een lagere gemiddelde *latency to feed intake* waargenomen dan in de vijf andere groepen (*Two way ANOVA*,  $P_{\text{grootte klasse} \times \text{kweekstelsel}} = 0.005$ , Tabel 6.7), die onderling niet van elkaar verschilden (Fig. 6.9).

##### *Waterkwaliteit*

Gemiddelde waarden van het gehele experiment voor de gemeten waterkwaliteitsparameters en de minimale en maximale meetwaarden (range) worden per kweekstelsel weergegeven in Tabel 6.8.

De gemiddelde zuurstofverzadiging ( $n = 114$ ) varieerde van 168 tot 176% tussen kweeksystemen (Tabel 6.8) en was lager in het doorstroomstelsel dan in de beide recirculatiesystemen (*Two-way ANOVA*,  $P < 0.001$ ). Ook bestonden er verschillen in de gemiddelde zuurstofverzadiging in de kweeksystemen op de verschillende monsterdagen gedurende het experiment (*Repeated measurements ANOVA*,  $P < 0.001$ , Fig. 6.10), waarbij over het algemeen de zuurstofverzadiging in het doorstroomstelsel lager was dan in de beide recirculatiesystemen. Binnen kweeksystemen was de zuurstofverzadiging gelijk voor de tanks met grote en kleine tarbot (*Two-way ANOVA*,  $P = 0.95$ ).

De gemiddelde water temperatuur varieerde van 14.6 tot 15.4°C (Tabel 6.8). Door het gebruik van bronwater met een constante temperatuur, hebben seizoensinvloeden slechts in beperkte mate invloed op de watertemperatuur in het doorstroomstelsel en is deze temperatuur relatief constant gedurende het experiment (Fig. 6.11). De watertemperatuur in de beide recirculatiesystemen vertonen daarentegen een sterke seizoensfluctuatie, waarbij de grootste verschillen met het doorstroomstelsel in de zomermaanden optreedt (Fig. 6.11). De temperatuursfluctuatie is het grootst in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) (Tabel 6.8) als gevolg van de relatief kleinste invloed van de temperatuur van het verversingswater op de watertemperatuur in het stelsel.

Tabel 6.7. Zwemactiviteit en voeropname gedrag. Voor zwemactiviteit wordt getoond de gemiddelde meetwaarden per systeem (n = 42) en de gemiddelde meerwaarden per grootte klasse (grote tarbot n= 24, kleine tarbot n= 18). Gemiddelde meetwaarden gemarkeerd met verschillende letters verschillen significant (P<0.05).

	<b>Zwemactiviteit</b> (# zwembewegingen/vis/10min)	<b>Voeropname gedrag</b> (sec)
<b>Systeem</b>		
Doorstroom	0.57 <sup>a</sup>	1.87 (0.43)
RAS5%	0.64 <sup>a</sup>	2.37 (0.25)
RAS1%	0.34 <sup>b</sup>	2.19 (0.22)
<b>Grootteklasse</b>		
Klein	0.45	2.09 (0.47)
Groot	0.58	2.20 (0.23)
<b>P-waarden</b>		
Systeem	0.007	< 0.001
Grootteklasse	0.08	N.S.
Systeem * Grootte klasse	N.S.	0.005
<b>L.S.D. (5%)</b>		
Systeem	0.17	(log LSD) 0.05235
Grootteklasse	-	-
Systeem * Grootte klasse	-	0.04274

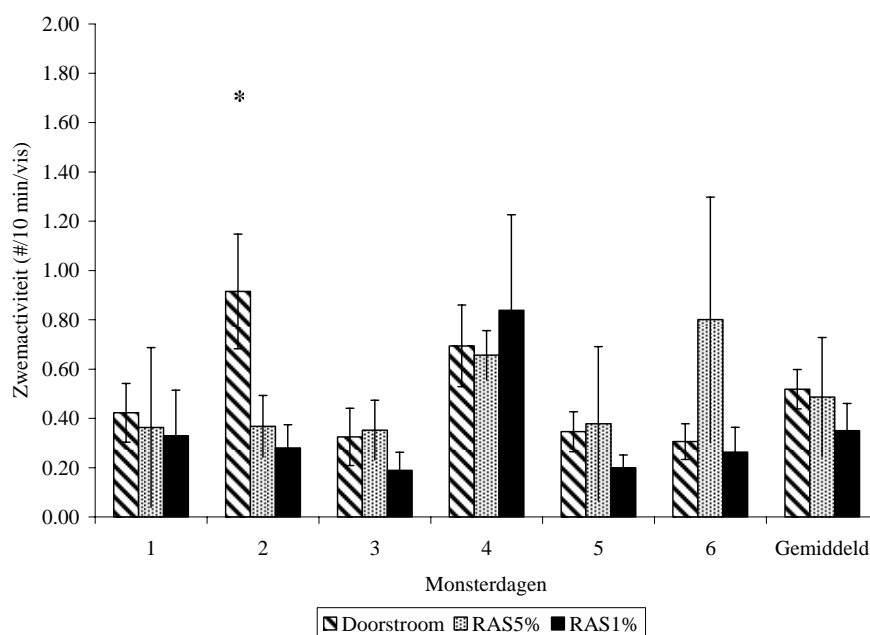


Fig. 6.7. Gemiddelde (n = 3) zwemactiviteit per monsterdag en de gemiddelde zwemactiviteit van alle monsterdagen (n = 18) per kweekstelsel voor de kleine tarbot. Meetwaarden gelabeld met (\*) verschillen significant (P < 0.05) van de andere meetwaarden op de betreffende monsterdag.

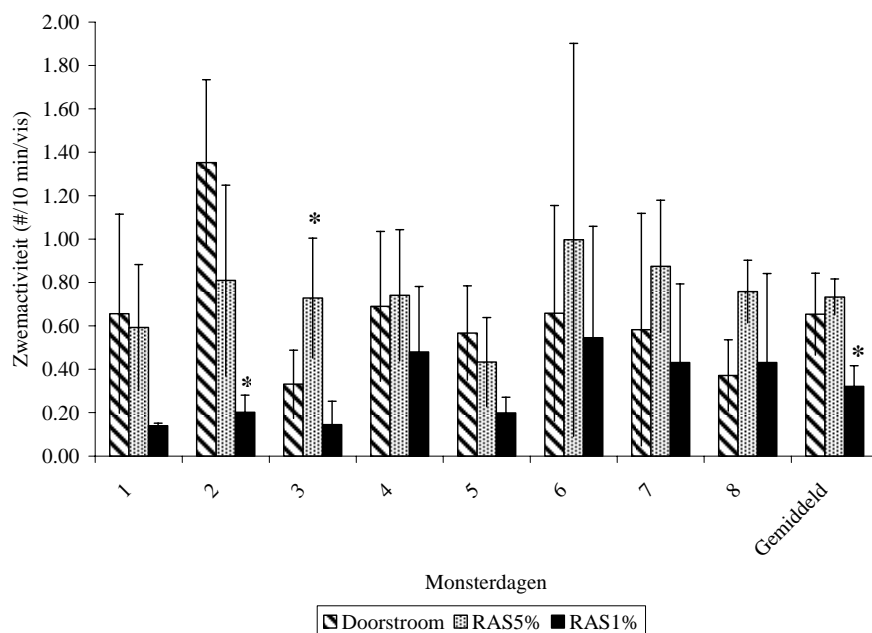


Fig. 6.8. Gemiddelde (n = 3) zwemactiviteit per monsterdag en de gemiddelde zwemactiviteit van alle monsterdagen (n = 24) per kweekstelsel voor de grote tarbot. Meetwaarden gelabeld met (\*) verschillen significant ( $P < 0.05$ ) van de andere meetwaarden op de betreffende monsterdag.

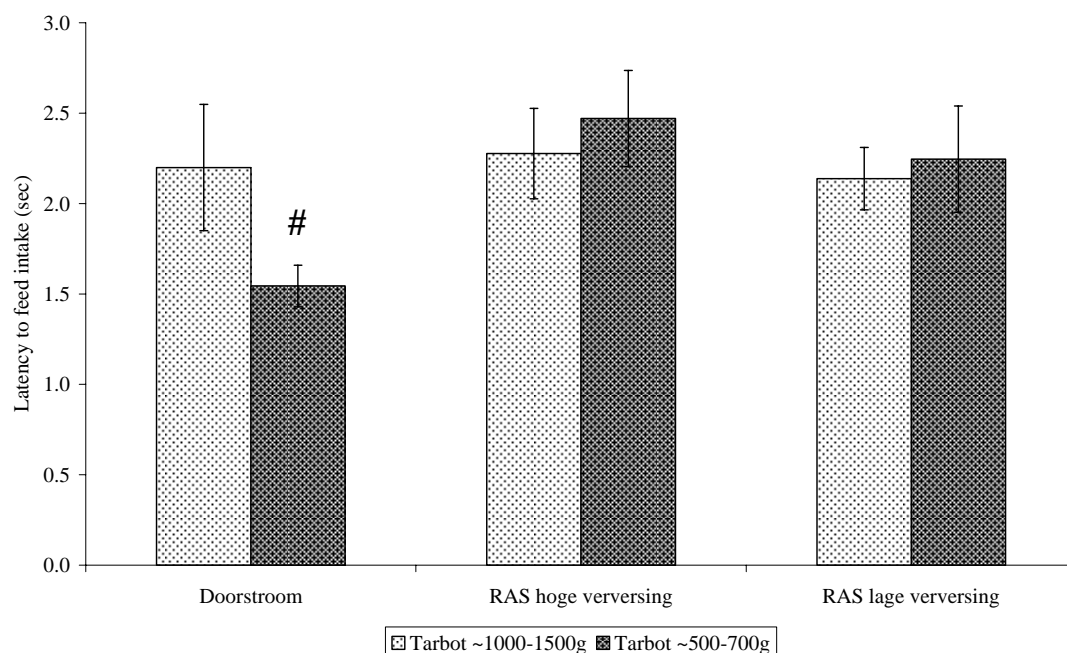


Fig. 6.9. Gemiddelde reactiesnelheid op het aanbieden van voer (*Latency to feed intake*) voor de drie kweeksystemen en twee grootte klassen. De gemiddelde reactiesnelheid gemarkeerd met (#) is significant verschillend van de rest.

#### Waterkwaliteit (vervolg)

De pH van alle drie de kweeksystemen lag tussen 7.20 en 7.83 gedurende het experiment. De pH is relatief constant en vertoont weinig verschil tussen de kweeksystemen vanaf het begin van het experiment tot het moment waarop het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) nog verder gesloten wordt (Dag 396) (Fig. 6.12).



De gemiddelde concentratie van totaal ammonia stikstof (TAN) gedurende het experiment liep uiteen van 0.52 mg N/L in het doorstroom systeem tot 0.71 in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) (Tabel 6.8). De concentratie van totaal ammonia stikstof (TAN) was vrijwel gelijk voor de drie kweeksystemen tot het moment waarop de verversing van het meest gesloten systeem (RAS1%) verder verlaagd (Fig. 6.13).

De gemiddelde nitriet concentratie gedurende het experiment was 0.08 mg N/L in het doorstroom systeem en 0.30 mg N/L in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) (Tabel 6.8). De nitriet concentraties waren over het algemeen hoger in de twee recirculatiesystemen in vergelijking met het doorstroomsysteem (Fig. 6.14).

Tabel 6.8. Waterkwaliteitsparameters. Gemiddelde (SD) meetwaarden voor het gehele experiment en de minimale en maximale gemeten waarden (range).

Parameter	Eenheid	Doorstroom	RAS5%	RAS1%
Zuurstof verzadiging	(%)			
<i>Gemiddeld</i>		168 (2.8)	176 (2.3)	175 (2.1)
<i>Range</i>		156 - 181	147 - 198	150 - 198
Temperatuur	(°C)			
<i>Gemiddeld</i>		14.6 (0.8)	15.4 (2.0)	15.1 (2.4)
<i>Range</i>		13.5 - 16.5	12.5 - 18.0	11.5-18.3
pH				
<i>Range</i>		7.53 - 7.76	7.43 - 7.79	7.20 - 7.83
TAN	(mg/L)			
<i>Gemiddeld</i>		0.52 (0.17)	0.56 (0.19)	0.71 (0.28)
<i>Range</i>		0.25 - 0.85	0.25 - 0.97	0.35 - 1.38
Nitriet	(mg N/L)			
<i>Gemiddeld</i>		0.08 (0.07)	0.22 (0.16)	0.30 (0.10)
<i>Range</i>		0.02-0.19	0.05 - 0.69	0.12 - 0.45

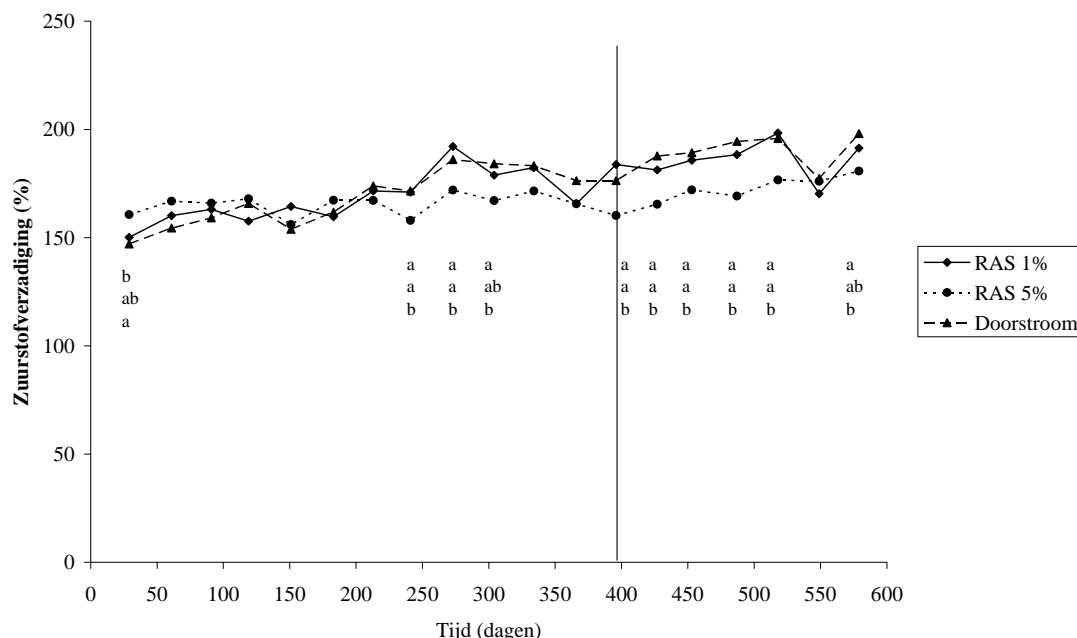


Fig. 6.10 Maandelijkse gemiddelde zuurstofverzadiging (n = 20) in het water van de drie kweeksystemen. Meetwaarden gemarkeerd met verschillende letters verschillen significant (P < 0.05). De verticale lijn geeft het tijdstip aan waarop de systeemverversing van RAS1% verlaagd is.

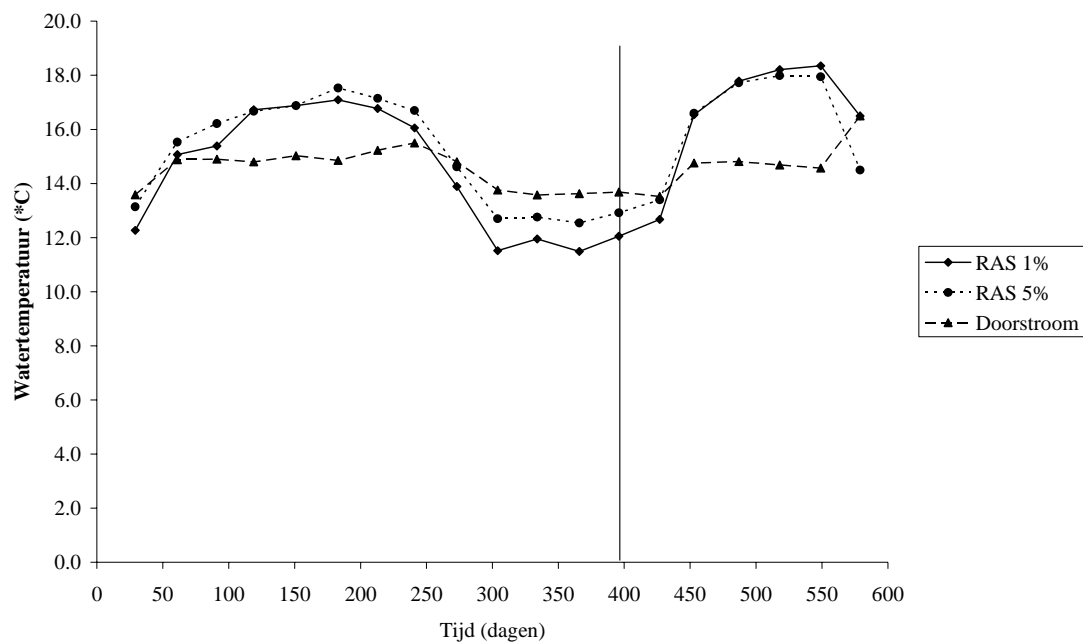


Fig. 6.11 Maandelijkse gemiddelde watertemperatuur (n = 20) van de drie kweeksystemen. De verticale lijn geeft het tijdstip aan waarop de systeemverversing van RAS1% verlaagd is.

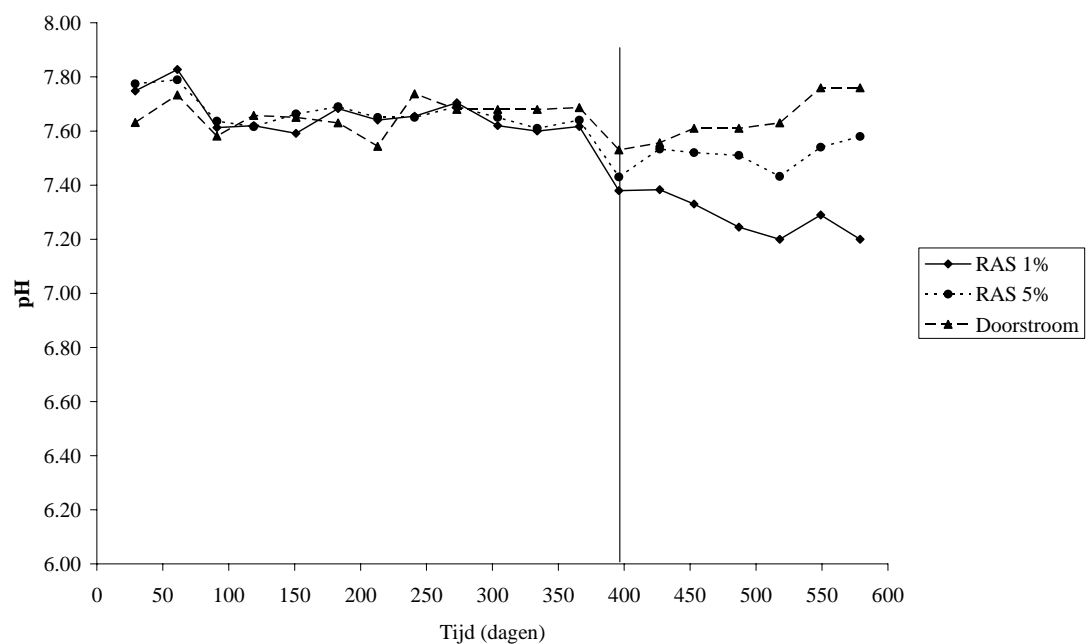


Fig. 6.12. pH van het water in de drie kweeksystemen. De verticale lijn geeft het tijdstip aan waarop de systeemverversing van RAS1% verlaagd is.

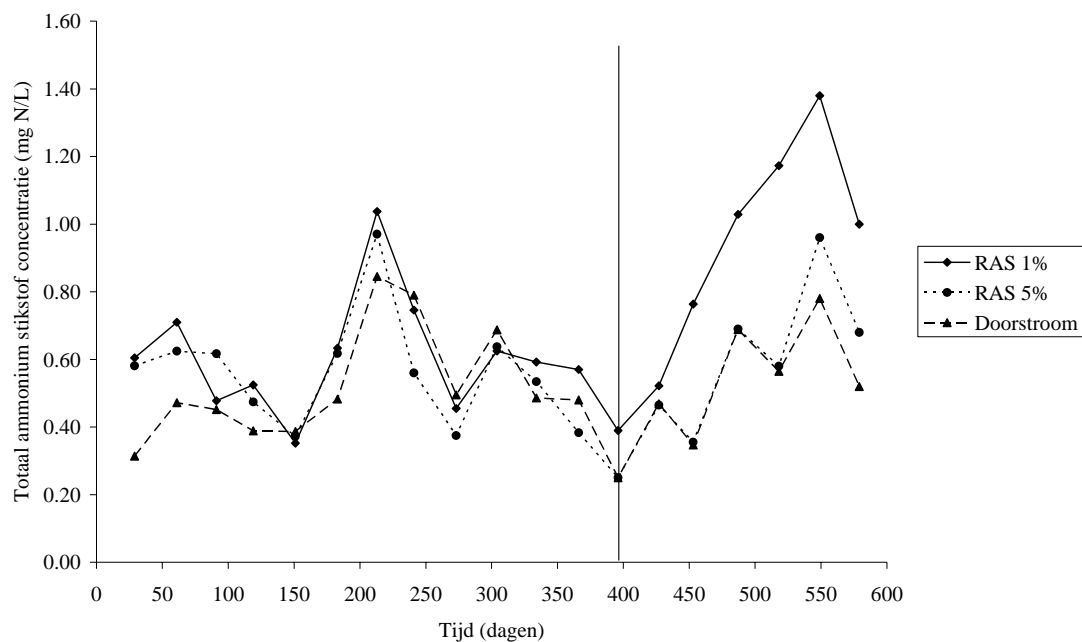


Fig. 6.13. Maandelijks gemiddelde van de concentratie totaal ammonium stikstof (TAN) in het water van de drie kweeksystemen. De verticale lijn geeft het tijdstip aan waarop de systeemverversing van RAS1% verlaagd is.

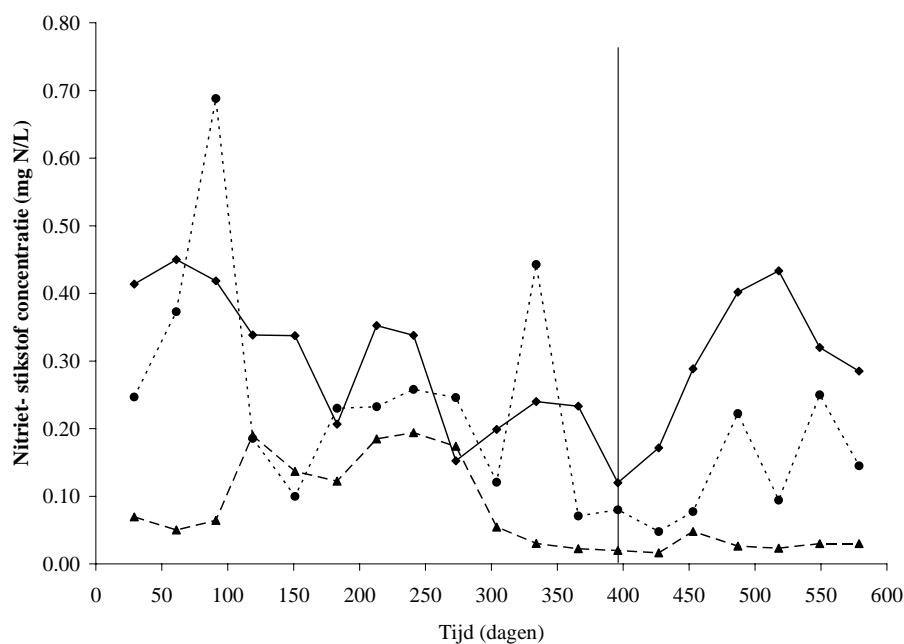


Fig. 6.14. Maandelijks gemiddelde van de nitriet-stikstofconcentratie in het water van de drie kweeksystemen. De verticale lijn geeft het tijdstip aan waarop de systeemverversing van RAS1% verlaagd is.

## 6.4 Discussie

### Effecten van kweeksystemen op voeropname en groei

In dit experiment werd geen effect van het kweekstelsel op groei waargenomen. Ook had het verlagen van de systeemverversing van het meest gesloten recirculatiesysteem geen effect op de groei van de vissen in dat systeem.

Voor regenboogforel (*Oncorhynchus mykiss*) is een vergelijkbaar experiment uitgevoerd waarin de groei en gezondheid van de vis in twee recirculatiesystemen met hoge en lage verversing en een doorstroomsysteem onderzocht werden. De aanleiding voor deze studie waren eerdere observaties waaruit opgemaakt werd dat mortaliteit toenam en de gezondheid verslechterde wanneer regenboog forel gekweekt werd in recirculatiesystemen met een lage verversing en een hoge voerbelasting. Dit onderzoek resulteerde niet in een bevestiging van eerdere observaties: een effect van kweekstelsel op de groei van regenboog forel werd niet gevonden (Good *et al.*, 2008).

De huidige resultaten voor tarbot zijn hiermee in overeenstemming en tonen met zekerheid aan dat er tot een systeemverversing van 610 L/kg voer geen groot effect is van het recirculeren van kweekwater op de groei van tarbot. Een klein effect van het recirculeren van kweekwater op groei van tarbot kan echter niet geheel worden uitgesloten omdat een dergelijk klein effect mogelijk gemaskeerd werd door andere factoren in het experiment, met name de wijze waarop de gewichten van de vissen bepaald werden.

In dit experiment werd wel een effect van het kweekstelsel op de voeropname waargenomen. De voeropname in de beide recirculatiesystemen was lager dan in het doorstroomsysteem. In combinatie met de gelijke groei, leidde dit tot een betere voerbenutting (lagere voederconversie) in de recirculatiesystemen. De betere voerbenutting in de recirculatiesystemen in vergelijking met het doorstroomsysteem stemt overeen met de algemeen geaccepteerde hypothese dat voerbenutting beter is in recirculatiesystemen. Als verklaring hiervoor wordt aangevoerd dat het milieu (waterkwaliteit en microbiologische flora en fauna) waarin de vissen zich bevinden stabiel is.

### Effecten van kweeksystemen op fysiologische parameters

Het in dit experiment gemeten hematocriet ligt voor alle kweeksystemen binnen de normale range voor tarbot van 11% tot circa 25% (Pichavant *et al.*, 2002; Person-Le Ruyet *et al.*, 2002; Cal *et al.*, 2005; Quentel en Obach, 1992). Tijdens de eerste bemonstering (Dag 258) werd geen effect van kweekstelsel op hematocriet waargenomen. Tijdens de tweede bemonstering werd een hogere hematocriet waargenomen in het meest gesloten recirculatiesysteem, waarbij opgemerkt moet worden dat binnen de grootte klassen geen effect van het kweekstelsel werd waargenomen (Tabel 6.5 en 6.6). Dit duidt er op dat de verschillen klein zijn. De waargenomen verschillen in hematocriet in relatie tot de kweeksystemen zijn lastig te verklaren. Hematocriet van juveniele tarbot is gerelateerd aan de zuurstofconcentratie, waarbij een lagere zuurstof concentratie resulteert in een hogere hematocriet (Pichavant *et al.*, 2002). In dit experiment kunnen de gemeten verschillen in zuurstofconcentraties de waargenomen verschillen in hematocriet echter niet verklaren. In de periode voorafgaand aan de tweede monsterdag (dag 552) is de zuurstofconcentratie het laagst in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) hetgeen niet resulteerde in hogere hematocriet in dit systeem (Fig. 6.10).

Op Dag 258 werden verschillen tussen kweeksystemen gevonden in de glucosegehalten in het bloedplasma. Het glucosegehalte was lager in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) dan in de twee andere kweeksystemen, die onderling niet verschilden. Op Dag 552 werden echter geen verschillen tussen kweeksystemen gevonden.

De in dit experiment waargenomen glucosegehalten lopen uiteen van circa 1.6 tot 2.4 mmol/L en liggen daarmee voor alle kweeksystemen op het niveau van niet gestresste tarbot. Normale waarden voor glucose in niet gestresste tarbot liggen tussen de 2 en de 3 mmol/L en het toepassen van acute stress leidt tot een kleine toename tot gehalten tussen de 3 en de 4 mmol/L (Van Ham *et al.*, 2003). De lagere glucosegehalten in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) waargenomen op Dag 258 houden mogelijk verband met de lagere zwemactiviteit die in dezelfde periode werd waargenomen in dit kweekstelsel voor met name de grote vissen.

In dit experiment werden verschillen in miltindex waargenomen tussen de kweeksystemen, zowel op Dag 258 als op Dag 552. Op Dag 258 was de miltindex het laagst in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) (Tabel 6.5), terwijl op Dag 552 de miltindex juist het hoogst was in dit kweekstelsel (Tabel 6.5). Voor alle drie de

kweeksystemen geldt echter dat de miltindex met waarden uiteenlopend van 0.10 tot 0.17% veel hoger is dan de 0.05% die is suggereert als een representatieve waarde voor gekweekte tarbot (Quentel en Obach, 1992). Doordat de milt een functie heeft in de opslag en productie van bloed, kan een vergroting van de milt indicatief zijn voor ziekte of immunologische problemen (Goede en Barton, 1990). Het gewicht van de milt, uitgedrukt als miltindex (*splenosomatic index*) fungeert daarmee als een eerste indicator voor de gezondheidsstatus van dieren die zijn blootgesteld aan gifstoffen (Hutchinson en Manning, 1996). Het is dus mogelijk dat het immuunsysteem van de tarbotten in dit experiment verhoogde activiteit vertoonde, relatief onafhankelijk van het kweekstelsel. In het recirculatiesysteem met de laagste verversing (RAS1%) werden in de grote vissen op Dag 552 hogere miltindices gevonden dan op Dag 258. Dit wijst op een toegenomen activiteit van het immuunsysteem in RAS1% tussen beide monsterdagen. Het is echter niet waarschijnlijk dat dit het gevolg van de verlaging van de verversing van het systeemwater in RAS1% aangezien de miltindex op Dag 552 niet verschilde tussen de kweeksystemen. Bovendien werd ook in het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) een verhoging van de miltindex waargenomen tussen Dag 258 en Dag 552. Het volledig ontbreken van meetbare leucocrietwaarden in alle kweeksystemen en op beide monsterdagen duidt er echter op dat ten tijde van de bemonstering geen sprake was van chronische dan wel acute ontstekingen in de bemonsterde tarbotten.

De conditiefactor verschilde niet tussen de kweeksystemen op Dag 258. Op Dag 552 werd een hogere conditiefactor waargenomen in het doorstroomsysteem ten opzichte van de beide recirculatiesystemen, die onderling niet verschilden in conditiefactor. Dit effect van kweekstelsel op conditiefactor is echter het gevolg van de hogere conditiefactor in het doorstroomsysteem en wordt niet veroorzaakt door een lagere conditiefactor in de recirculatiesystemen op Dag 552. Het is daarom onwaarschijnlijk dat het verschil in conditiefactor tijdens de tweede bemonstering toegeschreven moet worden aan de verlaging van de verversing van het systeemwater van het meest gesloten recirculatiesysteem die plaatsvond tussen de beide monsterdagen.

De cortisolgehalten in het bloedplasma verschilden niet tussen de kweeksystemen. Ook werd geen verschil gevonden tussen de grootte klassen en de monsterdagen. De grote standaard deviaties van de gemiddelde cortisolgehalten per kweekstelsel zijn het gevolg van de grote onderliggende variatie tussen individuele vissen binnen een behandeling, welke toegeschreven kan worden op individuele variatie in stress respons (Costas, 2008). Om deze reden werden op Dag 552 10 vissen per tank bemonsterd tegenover 5 vissen per tank op Dag 258, hetgeen inderdaad leidde tot lagere maar nog altijd relatief grote standaard deviaties. Daarom kan niet uitgesloten worden dat kleine verschillen in cortisolgehalten tussen kweeksystemen wel aanwezig waren maar op basis van de huidige data niet aangetoond konden worden. Zeker is echter dat het recirculeren van het kweekwater niet leidde tot grote verschillen in cortisolgehalten tussen kweeksystemen. Bovendien is met zekerheid aangetoond dat geen van de kweeksystemen leidde tot acute stress aangezien acute stress bij tarbot resulteert in cortisolgehalten in het bloedplasma van 50 tot 80 ng/ml, afhankelijk van saliniteit en watertemperatuur (Van Ham *et al.*, 2003), terwijl in dit experiment geen hogere gemiddelde cortisolgehalten dan 15.5 ng/ml gevonden werden.

### **Effecten van kweeksystemen op gedrag**

Voeropname gedrag werd gemeten als de reactiesnelheid van de tarbot op het aanbieden van voer (*latency to feed intake*). Tarbotten in het doorstroomsysteem reageerden sneller op het aanbieden van voer en dit effect kan worden toegeschreven aan de kleine vis (Fig. 6.9). De voergift was ook groter in het doorstroomsysteem vergeleken met de beide recirculatiesystemen (Tabel 6.4). Dit wijst erop dat voeropnamegedrag en voeropname aan elkaar gerelateerd zijn. De hogere opname in doorstroom leidde echter niet tot meer groei (Tabel 6.2), waardoor onduidelijk blijft of en op welke manier voeropnamegedrag en groei gerelateerd zijn.

De zwemactiviteit verschilde tussen de kweeksystemen. Het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) werd minder gezwommen dan in de beide andere kweeksystemen. In RAS1% was de zwemactiviteit lager en de voerbenutting beter dan in het doorstroom systeem. Een verband tussen zwemactiviteit en voerbenutting, waarbij een lagere zwemactiviteit leidt tot een betere voerbenutting doordat de energetische kosten van activiteit ten koste gaan van groei, is echter niet waarschijnlijk omdat voor RAS 5% een dergelijk verband niet blijkt. De voeropname en groei in RAS 5% verschilde niet met RAS1% terwijl de zwemactiviteit hoger was. Andersom was de voerbenutting in RAS 5% beter dan in het doorstroom systeem terwijl de zwemactiviteit niet verschilde.

### Effecten kweeksystemen op waterkwaliteit en de invloed van waterkwaliteit op de resultaten

Waterkwaliteitsparameters werden gemeten om de experimentele omstandigheden te bewaken en om de mogelijke invloed van waterkwaliteit op de resultaten van het experiment vast te kunnen stellen.

Over het algemeen was de zuurstofverzadiging in het doorstroomsysteem lager dan in de beide recirculatiesystemen (Fig. 6.10). Van juveniele tarbot is bekend dat de groei geremd wordt bij zuurstofconcentraties onder de 5.0 mg/L (~ 60% verzadiging) (Pichavant *et al.*, 2000), terwijl zuurstofverzadigingsniveau's van 147% en 223% geen groeibevorderend effect hadden op juveniele tarbot. Aannemende dat het effect van zuurstofverzadiging op groei van volwassen tarbot vergelijkbaar is met het juveniele tarbot, is het onwaarschijnlijk dat het verschil in zuurstofgehalten in het doorstroomsysteem enerzijds en de recirculatiesystemen anderzijds van invloed was op de groei van de vissen.

Het verschil in TAN concentratie dat na dag 400 van het experiment ontstaat tussen het doorstroomsysteem en het minst gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) enerzijds en RAS1% anderzijds (Fig. 6.13) werd waarschijnlijk veroorzaakt door de verlaging van verversing van RAS1%. Hierdoor werd minder TAN via verversing uit het systeem werd verwijderd terwijl de nitrificatiecapaciteit van het biofilter die in eerste instantie nog gelijk was aan de periode voor verlaging van de verversing. De daling van de TAN concentratie in RAS1% aan het einde van het experiment (Fig. 6.13) is mogelijk een gevolg van een toegenomen nitrificatiecapaciteit van het biofilter als reactie op de hogere TAN belasting.

De maximale TAN concentratie in het experiment is gemeten in RAS1% (1.37 mg N/L, Tabel 6.8). Bij een pH van 7.29 en temperatuur van 18.3°C komt dit overeen met een concentratie van niet geïoniseerd ammonia (NH<sub>3</sub>, de voor vissen toxische vorm) van 0.005 mg N/L (Huguenin & Colt, 2002). Van juveniele tarbotten (104g) is bekend dat de groei niet beïnvloed wordt door concentraties niet-geïoniseerd ammonia lager dan 0.10 mg N/L (Person-Le Ruyet *et al.*, 1997). Voor grote tarbot zoals is dit niet bekend. Aangezien de hoogste concentratie van niet geïoniseerd ammonia in dit experiment nog steeds 20 keer lager is dan de grenswaarde voor juveniele tarbot, is het onwaarschijnlijk dat verschillen in ammonia concentraties de groei van de vis in de experimentele behandelingen beïnvloed heeft.

De nitriet concentraties waren over het algemeen hoger in de twee recirculatiesystemen in vergelijking met het doorstroomsysteem (Fig. 6.14). Dit ligt voor de hand aangezien nitriet gevormd wordt als tussenproduct in het nitrificatieproces dat plaatsvindt in de biologische filters in de recirculatiesystemen. In het doorstroomsysteem ontbrak een biologisch filter hetgeen de mogelijkheden voor nitrietproductie beperkte tot de spontane nitrificatie in biofilms op de wanden van de tanks.

Van de fysiologische effecten van nitriet op mariene vissoorten is weinig bekend (Grosell en Jensen, 2000). Net als bij zoetwatervissen wordt nitriet opgenomen uit het water via de kieuwen en het darmkanaal. Doordat de opname via de kieuwen plaatsvindt in competitie met chloride, dat veel in zeewater zit, nemen mariene vissoorten minder makkelijk nitriet op dan zoetwater vissen (Jensen, 2003) en is nitriet een minder groot probleem in zeewater. Het is onbekend vanaf welke nitrietconcentraties de groei van tarbot negatief beïnvloed wordt, maar gesuggereerd wordt dat nitriet niet acuut toxisch is bij concentraties lager dan 220 mg/L, hetgeen overeenkomt met 67 mg N/L (Boeuf *et al.*, 1999). De vraag is echter of groei niet al bij een veel lager concentratie negatief beïnvloed wordt, aangezien voor juveniele kabeljauw is vastgesteld dat de groei reeds bij 1.0 mg N/L negatief beïnvloed wordt (Siikavuopio en Sæther, 2006). Omdat de hoogste nitrietconcentratie in dit experiment (0.69 mg N/L, Tabel 6.8) lager was dan deze grenswaarde voor kabeljauw en veel lager dan de acuut toxische concentratie voor tarbot, wordt aangenomen dat de verschillen in nitrietconcentraties in de kweeksystemen niet van invloed waren op de groei.

## 6.5 Conclusies

### *Groei en voeropname*

Een groot effect van de mate van verversing van het kweekwater in de recirculatiesystemen op de groei van tarbot kon in dit experiment niet worden aangetoond. Gezien de mogelijkheid dat een klein effect van kweekstelsel in dit experiment gemaskeerd werd door andere factoren, met name de wijze waarop de groei gemeten is, kan een klein effect van kweeksystemen op groei niet geheel worden uitgesloten. Zeker is echter wel dat als er een effect van kweekstelsel op groei van tarbot bestaat, dit effect klein is.

### *Fysiologie & immunologie*

De lage concentraties van glucose en cortisol in het bloedplasma tonen aan dat de vissen in alle drie de kweeksystemen niet leiden aan stress.

Immunologische parameters hematocriet en miltindex vertonen geen tot kleine verschillen tussen kweeksystemen, zonder dat een duidelijk verband met de mate van recirculatie van het kweekwater bestaat. Leucocriet was in het geheel niet waarneembaar, hetgeen duidt op de afwezigheid van ontstekingen in alle kweeksystemen.

Op basis van deze waarnemingen wordt geconcludeerd dat het recirculeren van het kweekwater niet lijkt te leiden tot een verhoogde activiteit van het immuunsysteem, niet leidt tot grote fysiologische veranderingen in tarbot en niet leidt tot stress bij tarbot.

### *Gedrag*

Grote tarbotten waren minder actief in het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%). Voor kleine tarbotten werd geen verschil in zwemactiviteit waargenomen tussen kweeksystemen.

In het doorstroomsysteem reageerden de grote tarbotten sneller op het aanbieden van voer, zonder dat dit leidde tot meer groei.

## 7. Het effect van recirculatie van kweekwater op groei en fysiologie van tong (*Solea solea*)

Edward Schram, Jan van der Heul, Tim Huijter en Wout Abbink  
Wageningen IMARES, Afdeling Aquacultuur

### 7.1 Inleiding

Een belangrijk uitgangspunt in dit project was dat groeiremming van vissen gekweekt in recirculatiesystemen veroorzaakt wordt door de productie en accumulatie van groeiremmende stoffen in het kweekwater. De vraag deed zich voor of dergelijke stoffen soortspecifiek zijn, dan wel effecten hebben op andere vissoorten dan alleen de producenten van deze stoffen. Beantwoording van deze vraag draagt bij aan het inzicht in de oorzaken van groeiremming in recirculatiesystemen.

Om de vraag te beantwoorden of groeiremmende stoffen geproduceerd door tarbot ook effecten hebben op andere vissoorten was het oorspronkelijk de bedoeling om experimentele eenheden met daarin tongen (*Solea solea*) op te nemen in een recirculatiesysteem met tarbot en de groei van de tongen te monitoren. Aangezien er geen groeiremming van tarbot in het recirculatiesysteem gemeten kon worden (Hoofdstuk 6), werd het onwaarschijnlijk geacht dat groeiremmende stoffen aanwezig waren in het recirculatiesysteem, waardoor het effect hiervan op de groei van tong niet onderzocht kon worden. Om die reden is gekozen voor een alternatieve invulling van dit projectonderdeel. In een experiment is het effect van recirculatie van het kweekwater op groei en fysiologie van tongen onderzocht. De doelstelling was het verkrijgen van inzicht in de betekenis van recirculatie van kweekwater voor de groei en fysiologie van tong. In combinatie met vergelijkbaar onderzoek aan tarbot wordt bovendien meer inzicht verkregen in de generieke effecten van recirculatie van kweekwater.

### 7.2 Materialen en Methoden

#### *Experimentele opzet*

Het effect van recirculatie van kweekwater op groei en fysiologie van tongen is vastgesteld door verschillende groepen tongen gedurende 56 dagen op te kweken in recirculatiewater, bronwater en een mengsel hiervan in de verhouding 1:1 (Mix). Deze drie behandelingen werden driemaal herhaald.

Het experimentele systeem (Fig. 7.1) bestond uit negen glazen aquaria (70x70x50 cm) en een water volume van 140L en drie buffertanks (1m<sup>3</sup>, polyethyleen). Voor elke behandeling werd een set van drie aquaria en een buffertank gebruikt. Vanuit de buffertanks stroomde het water onder constante druk en vrij verval naar de bijbehorende aquaria. Daarnaast werden de buffertanks gebruikt om het water voor te behandelen. De voorbehandeling van het water in de buffertanks had als doel de zuurstofverzadiging, temperatuur en ammoniacconcentratie gelijk te maken voor alle drie de behandelingen. Hiervoor werden alle drie de buffertanks sterk belucht om een zuurstofverzadiging van 100% te bereiken, waarbij in het recirculatiewater de oververzadiging van zuurstof teniet gedaan werd terwijl het bronwater juist van zuurstof werd voorzien. Het bronwater werd verwarmd tot het niveau van het recirculatiewater door het in de buffertank aanbrengen van verwarmingsslangen aangesloten op een CV installatie. Een *beadfilter* (Polygeyser DF-6, Aquaculture systems technologies, L.L.C) werd parallel aan de buffertank van het bronwater geïnstalleerd om het in het bronwater aanwezige ammonia (12 mg N/L) te verwijderen.

Het recirculatiewater werd rechtstreeks afgetapt van een recirculatiesysteem van tongkwekerij Solea BV, IJmuiden, Nederland. Dit recirculatiesysteem bestond uit 28 tanks (raceways) met een totaal oppervlak van 2000 m<sup>2</sup>. Het totale systeemvolume bedroeg 200 m<sup>3</sup>. De waterbehandeling bestond uit een trickling filter van 90 m<sup>3</sup> en een drumfilter (Hydrotech, 40 µm). Tijdens het experiment was de voerbelasting van het recirculatiesysteem 60kg/dag. Het gemiddelde gewicht van de tongen in het recirculatiesysteem liep uiteen van 10 tot 600g tijdens de experimentele periode. De verversing van het recirculatiesysteem ca. 1000L/kg voer. Het bronwater was afkomstig uit een bron van 120 m diepte. Voordat het bronwater de buffertank bereikte werd het ontijzerd.



Het mengsel van bronwater en recirculatiewater ontstond door gelijke hoeveelheden bronwater en recirculatiewater vanuit de respectievelijke buffertanks in de Mix buffertank te pompen. Goede menging voordat het water naar de aquaria stroomde werd bereikt door sterke beluchting.

De debieten over de experimentele aquaria werden ingesteld op 186L/uur hetgeen overeenkomt met 1.33 keer het aquariumvolume per uur. De aquaria waren voorzien van een oppervlakte afvoer waardoor niet gegeten voer (deels) in de aquaria achterbleef. Dagelijks werd voorafgaand aan het voeren uit elk aquarium de achtergebleven voerresten van de vorige voerperiode verwijderd door het aflaten van circa driekwart van het watervolume in het aquarium waarbij tijdelijk werd omgeschakeld op een bodemafvoer.

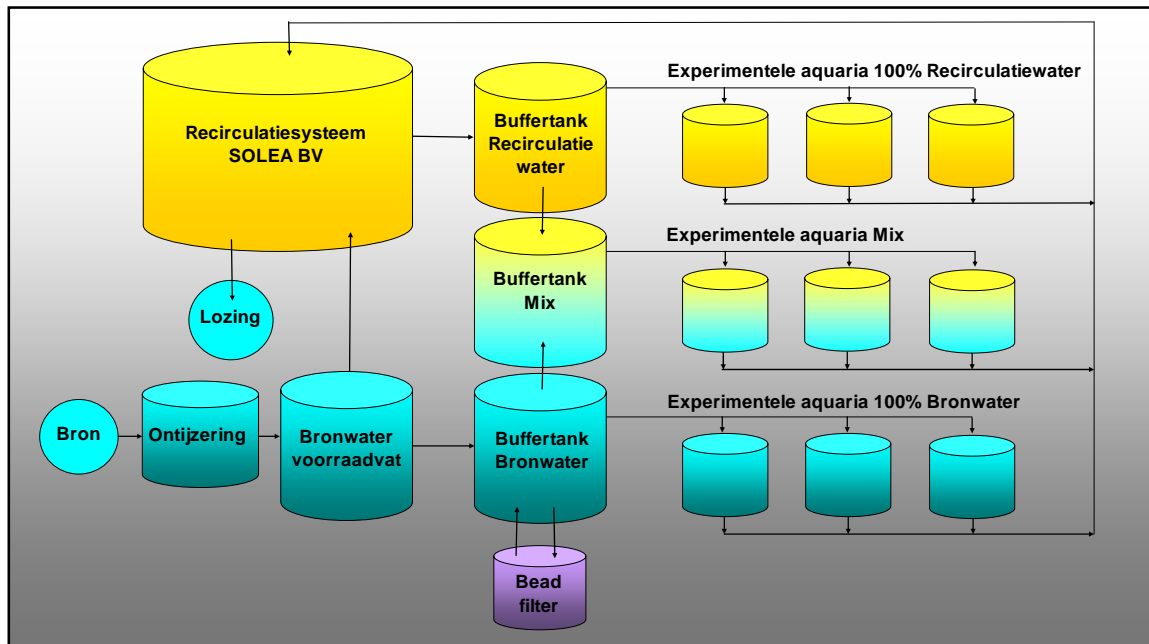


Fig. 7.1 Schematische weergave van de experimentele opstelling.

Een totaal van circa 200 tongen (*Solea solea*) met een gewicht tussen de 80 en 120g werd geselecteerd uit de productie van Solea BV. Een totaal van 180 vissen met een gemiddeld (S.D.) gewicht van 100.6 (3.6) g werden willekeurig over de negen aquaria verdeeld zodat elk aquarium bezet werd met 20 vissen. Tijdens de acclimatisatieperiode van 14 dagen werden 6 vissen dood aangetroffen en vervangen uit het restant van de 200 geselecteerde vissen.

Tijdens de acclimatisatieperiode en het experiment werd elke aquarium gevoerd met DAN-EX 1562 3mm pellets met een eiwitgehalte van 58% en een vetgehalte van 15%. Het voer werd dagelijks van 10.00 tot 06.00 (20 uur) verstrekt met een bandvoerautomat op een gemiddeld niveau van 1%/dag. Op de monsterdag (dag 56) en de dag daarvoor (Dag 55) werd niet gevoerd omdat de cortisol en glucosegehalten in het bloedplasma beïnvloed kunnen worden door voeropname (Arends *et al.*, 1999).

#### Metingen en bemonsteringen

##### Productieparameters

Op de eerste dag van het experiment (Dag 1) en op de laatste dag (Dag 56) van het experiment werden alle vissen individueel gewogen (Mettler PM34) en alleen op Dag 56 ook de totale lengte bepaald. De specifieke groeisnelheid (SGR) werd per aquarium als volgt vastgesteld:

$$\text{Specifieke groeisnelheid (\%/day) SGR} = (\ln(W_t) - \ln(W_0)) * 100/T$$

Waar  $W_0$  en  $W_t$  het gemiddelde ( $n = 20$ ) individuele gewicht waren op Dag 1 en Dag  $t$  en  $T$  de duur van het experiment (56 dagen).

Het voerverlies werd dagelijks vastgesteld door de niet opgegeten voerpellets te verwijderen uit de aquaria (zie boven), te tellen en het aantal te vermenigvuldigen met het gewicht van een droge voerpellet, dat was vastgesteld op 0.0161g/pellet door 1039 pellets te wegen. De totale voeropname werd vastgesteld per tank als het verschil tussen de totale voergif en het totale voerverlies.

De voerbenutting werd berekend als de voederconversie (FCR): de benodigde hoeveelheid voer voor het realiseren van 1kg groei. FCR werd als volgt per aquarium vastgesteld:

$$\text{Voederconversie (kg/kg) FCR} = \frac{\text{Total Feedload}}{(W_t - W_0)}$$

Waarbij  $W_0$  en  $N_0$  het gemiddelde individuele gewicht en het aantal vissen in het aquarium zijn bij de start van het experiment (dag 1),  $W_t$  en  $N_t$  het gemiddelde individuele gewicht en het aantal vissen in het aquarium zijn aan het einde van het experiment (Dag 56) en *Total Feed load* de totale voeropname gedurende het experiment in het aquarium. Bekend is dat niet alle voerpellets daadwerkelijk teruggevonden werden. Een aanzienlijk deel viel uit elkaar gedurende de voerperiode. Hierdoor wordt het werkelijke voerverlies onderschat en de voeropname en de voederconversie overschat.

De conditiefactor (CF) beschrijft de relatie tussen de lengte en het gewicht van een vis, waarbij magere vissen een lagere conditiefactor hebben. CF werd als volgt berekend voor individuele vissen aan het einde van het experiment:

$$CF = 100 \times \frac{W_t}{L_t^3}$$

Waarbij  $W_t$  is het individuele gewicht op dag 56 en  $L_t$  de individuele totale lengte op dag 56. Per tank werd de gemiddelde conditiefactor uitgerekend ( $n = 20$ )

De variatiecoëfficiënt (CV) beschrijft de spreiding van de individuele gewichten binnen een groep vissen. De variatiecoëfficiënt aan het begin (Dag 1) en het einde (Dag 56) van het experiment werd als volgt per aquarium berekend:

$$\text{Variatiecoëfficiënt (\%)} \quad CV = \frac{SD}{W}$$

Waarbij  $W$  het gemiddelde gewicht ( $n = 20$ ) is van de vissen in de tank en  $SD$  de standaard deviatie van het gemiddelde gewicht.

#### *Fysiologische en immunologische parameters*

Op de laatste dag van het experiment (dag 56) zijn 10 vissen per aquarium bemonsterd op cortisol, glucose en lactaatgehalten in het bloedplasma, hematocriet, leucocriet en miltgewicht. De te bemonsteren vissen werden per tank verzameld en verwerkt voordat de volgende tank bemonsterd werd. Per tank werden 10 vissen met een net uit een aquarium geschept. De vissen werden vervolgens met een harde klap op de kop gedood. Door de vissen snel uit het aquarium te verwijderen en daarna onmiddellijk te doden werd voorkomen dat het vangen van de vis ten behoeve van de bemonstering leidde tot een stress reactie die de daarop volgende metingen van met name cortisol beïnvloed.

De bemonsterde vissen werden individueel gewogen en de lengte gemeten, gevolgd door het nemen van een bloedmonster met een gehepariniseerde injectienaald onder de wervelkolom bij de staart. Het bloedmonsters werd vervolgens overgebracht in een eppendorf cupje. Zodra alle bloedmonsters per aquarium verzameld waren, werden de bloedcellen van het bloedplasma gescheiden door de monsters circa 8 minuten te centrifugeren op 10.000 toeren/min. In de tijd tussen het verzamelen en centrifugeren werden de bloedmonsters op scherfijs bewaard. Na centrifugeren werd het bloedplasma verwijderd met een automatische pipet en gelijk verdeeld over drie eppendorf cupjes ten behoeve van de cortisol, glucose en lactaat analyses. De plasmamonsters werden op locatie tijdelijk opgeslagen in een vriezer op -30°C, waarna de monsters werden overgebracht en opgeslagen in een vriezer op -70°C voorafgaand aan de analyses.

Hematocriet werd per vis in duplo bepaald. Hematocrietcapillairen werden gevuld met bloed door deze vlak na verzameling in de eppendorf met het bloedmonster te plaatsen, waarna ze afgedicht werden met wax en gedurende 3 minuten werden gecentrifugeerd bij 10.000 toeren/min (Mikrohamatocrit). De hoogte van de bloedcellen en totale hoogte van de inhoud van de capillairen (plasma en bloedcellen) werd gemeten met een digitale schuifmaat op 0.1 mm nauwkeurig. Het hematocriet gehalte volgt vervolgens uit:

$$\frac{\text{Hoogte bloedcellen}}{(\text{Hoogte bloedcellen} + \text{hoogte bloedplasma})} \times 100\%$$

Het hematocriet gehalte per vis volgt uit het gemiddelde van de duplo metingen per vis. Het hematocriet gehalte per tank volgt uit het gemiddelde van de hematocrietgehalten van de vissen uit de tank.

De hoeveelheid witte bloedcellen was in alle gevallen te klein om een nauwkeurige meting van de hoogte van de kolom te kunnen verrichten, waardoor alleen de aan- of afwezigheid van witte bloedcellen kon worden vastgesteld. Per vis werden twee waarnemingen gedaan in de hematocrietcapillairen (zie boven), hetgeen resulteerde in 20 metingen per tank. Het aantal waarnemingen van witte bloedcellen is uitgedrukt als percentage van de 20 metingen per tank.

Het miltgewicht werd bepaald door de buikholte van de dode vis open te snijden en de milt te verwijderen en te wegen (Mettler PM4600). Om het miltgewicht onafhankelijk te maken van de grootte van de vis is deze per individuele vis uitgedrukt als percentage van het gewicht: de miltindex.

Cortisol is gemeten met behulp van RIA (radio-immuno-assay) (MP-biomedicals) en glucose is gemeten op de VETTEST 8008 dry chemistry analyser, beiden door de universiteit van Leuven, België.

#### *Waterkwaliteit*

Temperatuur, zuurstofconcentraties en pH (Hach Lange HQ 40D) werden dagelijks gemeten in elk aquarium. Totaal ammonium stikstof (Merck 1.14558), nitriet (Merck 1.14547) en nitraat (Merck 1.4556) werden in alle aquaria gemeten op dag 13, 20, 27, 41 en 55 van de experimentele periode.

#### *Huidparasieten*

De dag na beëindiging van het experiment zijn per aquarium vier vissen bemonsterd op huidparasieten. Van elke vis werd achter de borstvin een monster genomen van de slijmlaag. Voor elk monster de aanwezigheid van vier categorieën huidparasieten *nematoden*, *sucteria*, *euplotes* en *copopoden* gescoord in vijf klassen: afwezig, 1-2 aanwezig, meerdere aanwezig, veel aanwezig en heel veel aanwezig.

#### *Berekeningen en statistiek*

Alle statistische procedures werden uitgevoerd met GenStat 10.1. Verschillen werden als significant aangemerkt bij  $P < 0.05$ .

#### *Productieparameters*

Verschillen in  $W_0$ ,  $W_t$ , Voeropname, SGR, FCR, CF en CV tussen behandelingen werden op significantie getoetst met *One-way ANOVA*, en in geval van significantie gevolgd door een *least significant differences* (LSD) *post hoc* analyse om significant verschillende metingen te identificeren.

#### *Fysiologische parameters*

De fysiologische parameters betreffen metingen op individu niveau, de gemiddelden daarvan vormen de meetwaarde per tank. Bij de statistische analyse van de metingen worden deze waarden per tank beschouwd aangezien niet de individuele vis maar de tank de experimentele eenheid was in dit experiment.

Alle fysiologische parameters zijn getoetst op verschillen tussen behandelingen met *One-way ANOVA*, en in geval van significantie gevolgd door een *least significant differences* (LSD) *post hoc* analyse om significant verschillende metingen te identificeren.

#### *Huidparasieten*

Voor elk van de vier categorieën parasieten werd de individuele scores in klassen omgerekend naar frequenties per tank. Uit de frequenties per tank volgde een gemiddelde frequentie ( $n = 3$ ) per behandeling.

#### *Waterkwaliteit en debieten*

Gemeten waterkwaliteitsparameters en debieten werden getoetst op verschillen tussen behandelingen en in de tijd met *repeated measurements ANOVA*, en in geval van significantie gevolgd door een *least significant differences* (LSD) *post hoc* analyse om significant verschillende metingen te identificeren.

### 7.3 Resultaten

#### *Productieparameters*

Het begingewicht was gelijk voor de drie behandelingen (Tabel 7.1). De gemiddelde specifieke groeisnelheid (SGR) was bijna twee keer hoger voor de vissen gehouden in het bronwater dan voor de vissen gehouden in het recirculatiewater (Tabel 7.1, Fig. 7.2). De gemiddelde SGR van de vissen gehouden in de mix van bronwater en recirculatiewater lag tussen de SGR gemeten voor het bronwater en recirculatiewater in, en verschilde niet van deze beide behandelingen (Tabel 7.1, Fig. 7.2).

Tijdens het experiment werden in totaal zes vissen dood aangetroffen, 3.3% van de totale populatie. De overleving verschilde niet tussen de behandelingen (Tabel 7.1). De spreiding van de gemiddelde gewichten nam toe tijdens het experiment ( $dCV > 0$ ). Het verschil in de variatiecoëfficiënt op dag 1 en dag 56 ( $dCV$ ) verschilt echter niet tussen de behandelingen (Tabel 7.1).

Tabel 7.1 Gemiddelden en standaard deviaties ( $n=3$ ) van productieparameters per experimentele behandeling. BRON is bronwater, RAS is recirculatiewater, MIX is het mengsel van bronwater en recirculatiewater. P-waarden resulteren uit *One way ANOVA*. *Least significant difference* (L.S.D.) geeft het minimale onderlinge verschil aan tussen gemiddelde waarden waarbij het verschil als significant aangemerkt wordt ( $P < 0.05$ ). Waarden gemarkeerd met verschillende letters zijn significant verschillend ( $P < 0.05$ ). Geen letter, geen significantie verschillen.

Parameter	BRON	MIX	RAS	P-waarde	L.S.D.
Begin gewicht (g)	97.7 (4.4)	100.7 (0.6)	103.4 (2.9)	0.16	-
Eindgewicht (g)	121.4 (8.1)	119.3 (6.2)	115.7 (4.1)	0.57	
SGR (%/d)	0.39 (0.04) <sup>a</sup>	0.30 (0.08) <sup>ab</sup>	0.20 (0.07) <sup>b</sup>	0.04	0.137
Conditiefactor	0.94 (0.03)	0.92 (0.04)	0.92 (0.01)	0.58	
Voeropname (g)	1003 (40) <sup>a</sup>	1094 (41) <sup>b</sup>	1108 (15) <sup>b</sup>	0.02	68
FCR	2.2 (0.3) <sup>a</sup>	3.1 (0.8) <sup>ab</sup>	4.9 (1.6) <sup>b</sup>	0.04	2.1
Overleving (%)	97 (3)	98 (3)	95 (9)	0.77	
dCV (%)	8.0 (0.6)	6.2 (1.6)	5.9 (1.1)	0.15	-

Tabel 7.2 Gemiddelden en standaard deviaties (n =3) van fysiologische parameters per experimentele behandeling. BRON is bronwater, RAS is recirculatiewater, MIX is het mengsel van bronwater en recirculatiewater. P-waarden resulteren uit *One way ANOVA*. *Least significant difference* (L.S.D.) geeft het minimale onderlinge verschil aan tussen gemiddelde waarden waarbij het verschil als significant aangemerkt wordt ( $P < 0.05$ ). Waarden gemarkeerd met verschillende letters zijn significant verschillend ( $P < 0.05$ ). Geen letter, geen significantie verschillen.

Parameter	BRON	MIX	RAS	P-waarde	L.S.D.
Hematocriet (%)	6.0 (0.4)	6.0 (1.0)	6.0 (1.7)	1.00	-
Leucocriet (%) <sup>*</sup>	59 (10)	48 (29)	50 (18)	0.81	-
Miltindex (%)	0.09 (0.02)	0.09 (0.01)	0.10 (0.02)	0.51	-
CF	0.94 (0.03)	0.92 (0.04)	0.92 (0.01)	0.58	-
Cortisol (ng/ml)	5.3 (7.0)	4.9 (2.6)	16.5 (4.7)	0.05	10.1
Glucose (mmol/L)	1.45 (0.2)	1.32 (0.3)	1.58 (0.2)	0.43	-
Lactaat	0.83 (0.3)	0.70 (0.1)	0.68 (0.2)	0.63	-

<sup>\*</sup>) uitgedrukt als het percentage monsters waarin leucocriet waarneembaar was.

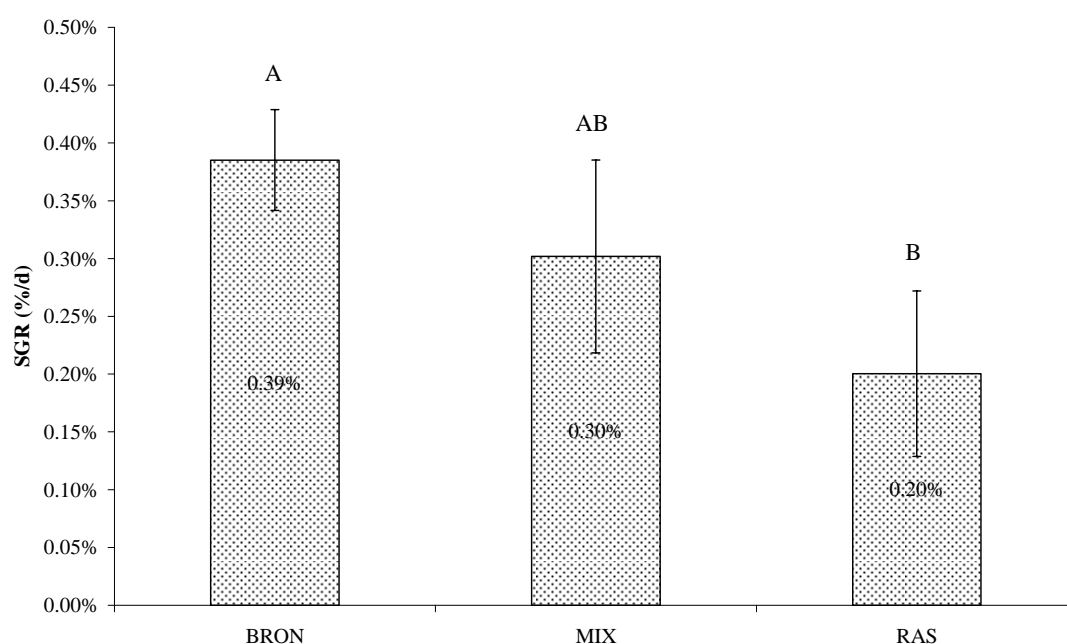


Fig. 7.2. Gemiddelde (n = 3) specifieke groeisnelheid (SGR) voor de drie behandelingen. BRON is bronwater, RAS is recirculatiewater, MIX is het mengsel van bronwater en recirculatiewater. Waarden gemarkeerd met verschillende letters zijn significant verschillend ( $P = 0.05$ ).

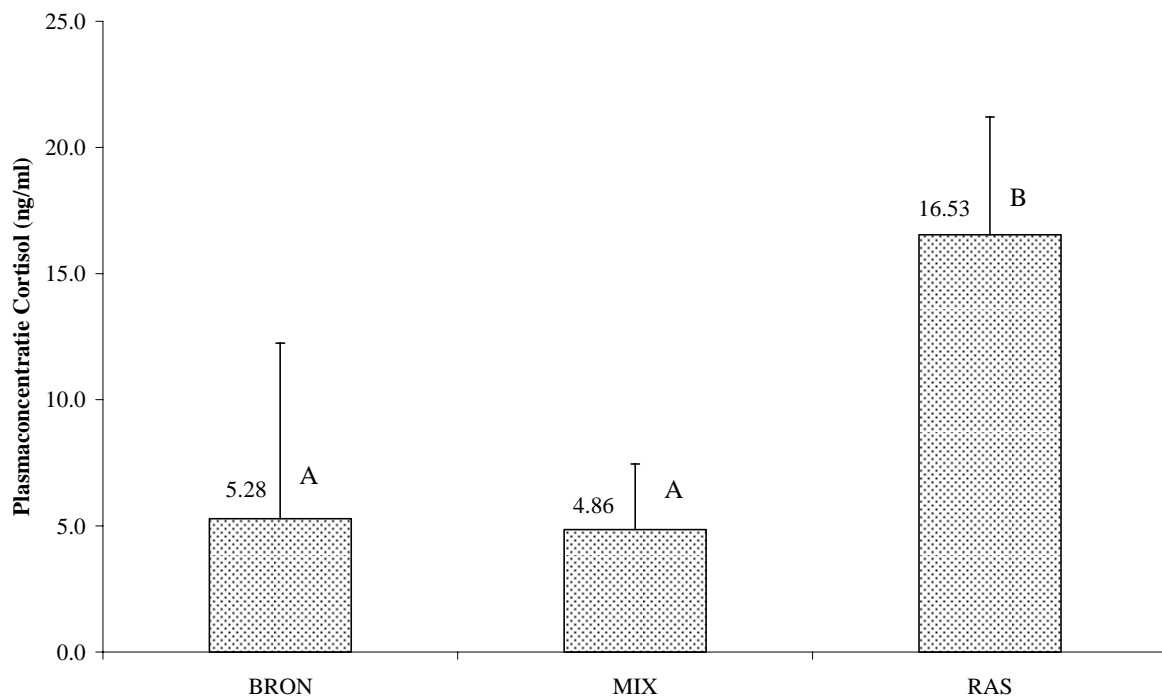


Fig. 7.3. Gemiddelde ( $n = 3$ ) cortisolconcentratie in het bloedplasma voor de drie behandelingen. BRON is bronwater, RAS is recirculatiewater, MIX is het mengsel van bronwater en recirculatiewater. Waarden gemarkeerd met verschillende letters zijn significant verschillend ( $P = 0.05$ ).

#### *Fysiologische en immunologische parameters*

De gemiddelde meetwaarden van de fysiologische en immunologische parameters worden weergegeven in Tabel 7.2. De cortisolconcentratie in het bloedplasma was significant hoger in RAS dan in MIX en BRON, die onderling niet verschilden (Tabel 7.2, Fig. 7.3). De andere fysiologische en immunologische parameters waren niet verschillend tussen de behandelingen.

#### *Huidparasieten*

De frequentie waarmee *nematoden*, *sucteria*, *euplotes* en *copopoden* werden waargenomen op de huid van de tongen in dit experiment wordt weergegeven in Fig. 7.4. De behandelingen verschillen in de hoeveelheid huidparasieten en de samenstelling van de totale populatie huidparasieten.

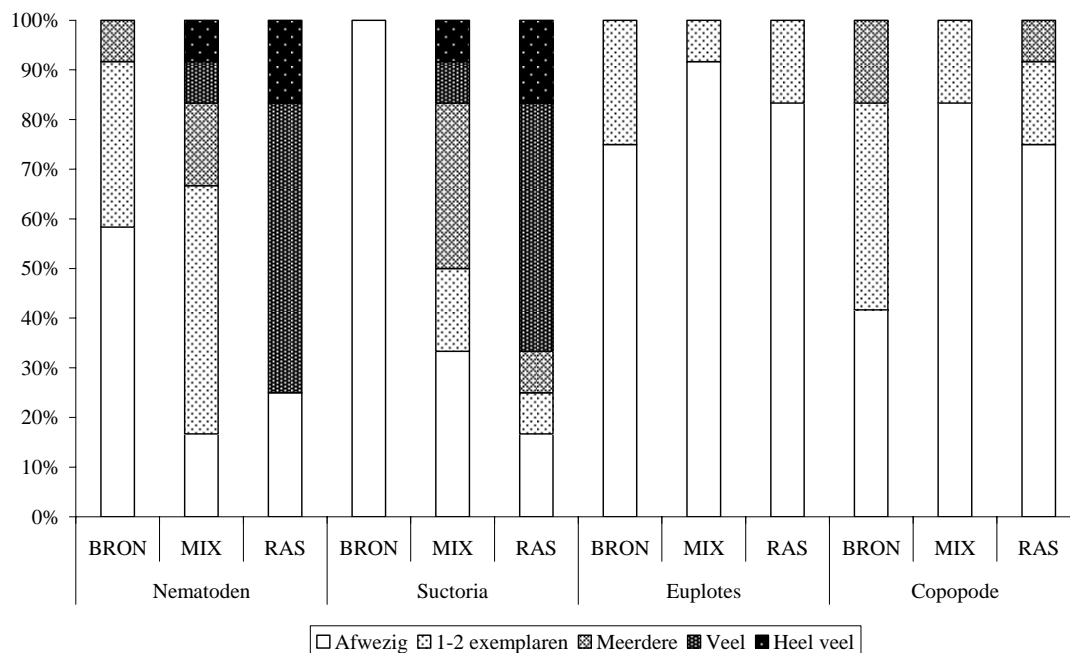


Fig. 7.4 De aanwezigheid van *nematoden*, *suctoria*, *euplotes* en *copepoden* op de huid van de tongen in dit experiment. Weergegeven wordt de gemiddelde frequentie ( $n = 3$ ) per behandeling waarmee *nematoden*, *suctoria*, *euplotes* en *copepoden* in de vijf klassen (zie legenda) gescoord zijn. BRON is bronwater, RAS is recirculatiewater, MIX is het mengsel van bronwater en recirculatiewater.

#### Waterkwaliteit en debieten

De gemiddelde ( $n=56$ ) debieten per behandelingen bedroegen 3.13, 3.06 en 3.07 L/min voor BRON, MIX en RAS. Het gemiddelde debiet van BRON was significant hoger (*repeated measurements ANOVA*,  $P_{\text{treatment}}=0.05$ ), dan van MIX en BRON die onderling niet verschilden. Het absolute verschil is echter klein en niet van invloed op het presenteren van de vissen. De debieten worden daarom in de discussie verder buiten beschouwing gelaten.

De resultaten van de ammonia, nitriet en nitraatmetingen worden weergegeven in Tabel 7.3. Op alle monsterdagen verschilde de totaal ammonia concentratie tussen de drie behandelingen. De hoogste waarden werden altijd gemeten in BRON en de laagste in RAS, MIX zat daar tussen in. In RAS verschilde de totaal ammonia concentratie niet tussen monsterdagen. Voor BRON en MIX was dit wel het geval. Ook de nitrietconcentraties verschilden tussen de behandelingen. In RAS was de nitrietconcentratie gedurende de gehele experimentele periode significant lager dan in BRON en MIX. De nitrietconcentratie in BRON was op de eerste twee monsterdagen hoger dan in MIX en gelijk aan elkaar op de drie laatste monsterdagen. Voor alle behandelingen bestonden daarnaast verschillen in nitrietconcentraties tussen de monsterdagen. De nitraatconcentraties verschilden tussen alle drie de behandelingen op alle monsterdagen, waarbij de hoogste concentraties werden gemeten in RAS en de laagste in BRON. MIX zat daar tussen in. Alleen in RAS werden significante verschillen in nitraatconcentratie waargenomen tussen de monsterdagen.

De minimale en maximale pH-waarde gemeten tijdens het experiment wordt voor elke tank weergegeven in Tabel 7.4. De pH-waarden waren iets lager in RAS. De verschillen tussen behandelingen zijn echter klein en worden daarom verder buiten beschouwing gelaten.

De concentratie opgeloste zuurstof liep uiteen van circa 6.0 tot 8.2 mg/L voor alle drie de behandelingen. De gemiddelde zuurstofconcentratie per behandeling laat een trend zien naar lagere concentraties in BRON (*One-way ANOVA*,  $P = 0.06$ ), Tabel 7.5). Daarnaast waren gemiddelde dagelijkse gemeten zuurstofconcentraties niet gelijk op alle meetdagen (*Repeated measurements ANOVA*,  $P_{\text{time} \times \text{treatment}} < 0.001$ ). De absolute verschillen zijn echter klein en niet van invloed op het presteren van de vissen. De zuurstofconcentratie wordt daarom in de discussie verder buiten beschouwing gelaten.

De gemiddelde water temperatuur per behandeling was hoger in RAS (*One-way ANOVA*,  $P < 0.001$ , Tabel 7.5). Het absolute verschil is met 0.1 °C echter zo klein dat het zeer onwaarschijnlijk is dat de watertemperatuur van

invloed was op het presenteren van de vissen. De watertemperatuur wordt daarom in de discussie verder buiten beschouwing gelaten.

Tabel 7.3. Gemiddelde (n=3, SD) ammonia, nitriet en nitraatconcentraties in de experimentele behandelingen op vijf monsterdagen. Per waterkwaliteitsparameter verschillen meetwaarden met gelijke letters per monsterdag niet tussen behandelingen (rijen) en verschillen meetwaarden met gelijke cijfers binnen behandelingen niet tussen monsterdagen (kolommen).

Dag	Ammonia (mg N/L)			Nitriet (mg N/L)			Nitraat (mg N/L)		
	BRON	MIX	RAS	BRON	MIX	RAS	BRON	MIX	RAS
13	4.2 (0.7) <sup>a,1</sup>	2.1 (0.3) <sup>b,1</sup>	0.8 (0.2) <sup>c</sup>	2.3 (0.4) <sup>a,1</sup>	1.3 (0.3) <sup>b,12</sup>	0.3 (0.0) <sup>c,12</sup>	6.6 (1.3) <sup>a</sup>	18.5 (3.7) <sup>b</sup>	31.7 (1.2) <sup>c,13</sup>
20	6.4 (0.4) <sup>a,2</sup>	3.3 (0.4) <sup>b,2</sup>	0.7 (0.1) <sup>c</sup>	2.3 (0.3) <sup>a,1</sup>	1.5 (0.3) <sup>b,1</sup>	0.6 (0.2) <sup>c,1</sup>			
27	10.9 (0.2) <sup>a,3</sup>	5.8 (0.0) <sup>b,3</sup>	0.4 (0.0) <sup>c</sup>	1.5 (0.0) <sup>a,2</sup>	1.2 (0.0) <sup>a,12</sup>	0.6 (0.0) <sup>b,1</sup>	3.9 (0.2) <sup>a</sup>	21.3 (1.1) <sup>b</sup>	43.4 (3.2) <sup>c,2</sup>
41	10.3 (1.1) <sup>a,34</sup>	4.9 (0.6) <sup>b,45</sup>	0.2 (0.0) <sup>c</sup>	1.4 (0.1) <sup>a,2</sup>	1.2 (0.2) <sup>a,2</sup>	0.5 (0.0) <sup>b,12</sup>	3.0 (0.3) <sup>a</sup>	17.7 (0.6) <sup>b</sup>	29.4 (1.7) <sup>c,1</sup>
55	9.7 (0.2) <sup>a,4</sup>	5.0 (0.2) <sup>b,5</sup>	0.2 (0.0) <sup>c</sup>	1.4 (0.1) <sup>a,2</sup>	1.1 (0.1) <sup>a,2</sup>	0.2 (0.0) <sup>b,2</sup>	3.5 (0.2) <sup>a</sup>	16.7 (3.8) <sup>b</sup>	27.1 (5.7) <sup>c,3</sup>
P <sub>b*t</sub>		<0.001			0.004			0.014	

Tabel 7.4. Hoogste en laagste gemeten pH waarden in de experimentele tanks.

Tank	BRON			MIX			RAS		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Min	7.22	7.20	7.02	7.33	7.26	7.30	7.26	7.31	7.26
Max	8.19	8.23	8.19	8.28	8.26	8.21	7.97	8.02	8.02

Tabel 7.5. Gemiddelde (n = 3x56) zuurstofconcentratie en watertemperatuur in de experimentele behandelingen. Meetwaarden gemarkeerd met verschillende letters verschillen significant van elkaar (*repeated measurements ANOVA*, P<sub>treatment</sub> <0.05).

	BRON	MIX	RAS	P-waarde
Zuurstof (mg/L)	7.24 (0.47)	7.37 (0.38)	7.31 (0.41)	0.06
Temperatuur (°C)	19.5 (0.8) <sup>a</sup>	19.5 (0.6) <sup>a</sup>	19.6 (0.5) <sup>b</sup>	< 0.001

## 7.4 Discussie

### *Productieparameters*

De specifieke groeisnelheid van de tongen werd sterk beïnvloed door de experimentele behandelingen (Fig. 7.2). De vrij kleine verschillen in voeropname in combinatie met de verschillen in groei, leidden tot verschillen in voederconversie (Tabel 7.1). De voeropname is zelfs het laagst in BRON terwijl de groei het hoogst was in BRON (Tabel 7.1). Opgemerkt moet worden dat het voerverlies onderschat werd doordat een deel van de niet gegeten voerpellets uit elkaar viel gedurende de voerperiode en daardoor aan het einde daarvan niet werd teruggevonden. Hierdoor is de voeropname en de voederconversie overschat. De absolute meetwaarden voor de voederconversie representeren daarom niet de werkelijke voerbenutting door de tongen. Echter, wanneer aangenomen wordt dat de teruggevonden fractie niet gegeten voerpellets gelijk was voor alle behandelingen, geven de gemeten voederconversies de relatieve verschillen in voerbenutting tussen de behandelingen goed weer. Geconcludeerd wordt daarom dat de waargenomen groeiverschillen het gevolg zijn van verschillen in voerbenutting en niet door veroorzaakt worden door verschillen in voeropname.

### *Waterkwaliteit*

De lage ammonia- en nitrietconcentratie in RAS zijn het gevolg van een goed functionerend biologisch filter in het recirculatiesysteem waaruit het water voor de experimentele RAS behandeling afkomstig is. De hogere ammonia



en nitrietconcentraties in BRON zijn het gevolg van de hoge ammonia concentratie in het bronwater (12 mg N/L) en een blijkbaar onvoldoende functionerend *beadfilter*, dat ammonia verwijdering uit het bronwater als functie had. De hogere nitraatconcentraties in RAS zijn het gevolg van de accumulatie van nitraat in het recirculatiesysteem waaruit het water voor de experimentele RAS behandeling afkomstig is. De hoogst gemeten concentratie totaal ammonia is 10.9 mg N/L. Op basis van de pH, watertemperatuur en de saliniteit kan concentratie van de voor vissen giftige niet-geïoniseerde vorm ( $\text{NH}_3$ ) op 0.17 mg N/L geschat worden, terwijl de NOEC (*no observed effect concentration*) voor groei van jonge tong is vastgesteld op 0.07 mg N/L (Alderson, 1979). Op basis hiervan kan gesteld worden dat de groei van de tong in BRON gedurende het experiment waarschijnlijk enige tijd negatief is beïnvloed door de ammonia concentratie en dat dit in de andere twee behandelingen niet het geval was. Dit betekent dat het waargenomen verschil in groei tussen BRON en de andere twee behandeling mogelijk nog groter was geweest bij gelijke ammoniacconcentraties tussen de behandelingen. Voor nitriet kan niet worden vastgesteld of de groei van de tongen beïnvloed werd door de concentratieverschillen tussen de behandelingen omdat grenswaarden voor groei ontbreken voor tong. Het is echter niet aannemelijk dat nitriet een grote invloed heeft gehad omdat de giftigheid van nitriet in zeewater wordt beperkt door de aanwezige chloride ionen. Het is ook niet bekend vanaf welke nitraatconcentratie de groei van tong negatief beïnvloed wordt. Algemeen wordt echter aangenomen dat vissen hogere nitraatconcentraties kunnen weerstaan dan de maximale waarden gemeten in dit experiment, zonder dat dit een negatief effect heeft op groei. Aangenomen wordt daarom dat verschillen in de nitraatconcentraties tussen de behandelingen geen effect hadden op de resultaten.

#### *Fysiologische en immunologische parameters*

De concentratie van cortisol in het bloedplasma van tong werd beïnvloed door de experimentele behandelingen (Tabel 7.2, Fig. 7.3). In RAS was het plasma cortisol gehalte significant hoger dan in BRON en MIX, die onderling niet verschilden. Cortisolniveau's in het bloedplasma wordt algemeen gebruikt als indicator voor stress in gewervelde dieren waaronder vis (Wendelaar Bonga, 1997) en in Atlantische tong (*Solea senegalensis*) ook als indicator voor chronische stress, waarin plasmaconcentraties uiteenlopen van circa 5 ng/ml in niet gestresste vis tot circa 25 ng/ml in gestresste vis (Costas *et al.*, 2008). Hieruit volgt dat de tongen in BRON en MIX hoogstwaarschijnlijk niet chronisch gestresst waren terwijl de tongen in RAS waarschijnlijk wel chronisch gestresst waren.

In het huidige experiment laten de onderliggende individuele meetwaarden grote variatie zien met meetwaarden uiteenlopend van 0 tot 80 ng/ml. Als verklaring voor de grote individuele verschillen in cortisolniveau's in het bloedplasma van Atlantische tong (*Solea senegalensis*) wordt gesuggereerd dat er grote individuele variatie bestaat in de stress respons (Costas *et al.*, 2008). Gezien de grote individuele verschillen in dit experiment lijkt ook bij tong (*Solea solea*) individuele variatie in stress respons te bestaan.

Een verhoging van het plasma cortisol leidt in vissen onder ander tot stimulatie van de productie van glucose en een verhoging van het glucosegehalte in het bloedplasma (Laiz-carrión *et al.*, 2003). Het glucosegehalte in het bloedplasma wordt daarom ook als indicator voor stress in vis gebruikt (Wendelaar Bonga, 1997). Een dergelijk effect van cortisol op glucose kon echter in dit experiment niet worden waargenomen. De glucosegehalten in het bloedplasma waren namelijk gelijk in alle drie de behandelingen. Daarnaast waren de glucosegehalten van circa 1.4 mmol/L opvallend laag ten opzichte van gehalten gerapporteerd voor Atlantische tong (niet gestresste Atlantische tong circa 12 mmol/L, gestresste Atlantische tong 36-48 mmol/L) (Costas *et al.*, 2008).

In dit experiment werden geen verschillen in miltindex waargenomen tussen de drie experimentele behandelingen (Tabel 7.2). Leucocrietgehalten verschilden ook niet tussen behandelingen en waren zeer laag waardoor slechts de aan- of afwezigheid van leucocriet kon worden vastgesteld. Doordat de milt een functie heeft in de opslag en productie van bloed, kan een vergroting van de milt indicatief zijn voor ziekte of immunologische problemen (Goede en Barton, 1990). Het gewicht van de milt, uitgedrukt als miltindex (*splenosomatic index*) fungeert daarmee als een eerste indicator voor de gezondheidsstatus van dieren die zijn blootgesteld aan gifstoffen (Hutchinson en Manning, 1996). De resultaten van dit experiment duiden er daarom op dat ten tijde van de bemonstering geen sprake was van chronische dan wel acute ontstekingen in de bemonsterde tongen.

Hematocrietgehalten lagen rond de 6% en waren niet verschillend tussen de behandelingen. Het ontbreekt aan gepubliceerde hematocrietgehalten voor tong waarmee de huidige resultaten vergeleken kunnen worden. Desondanks lijken de in dit experiment gemeten hematocrietgehalten laag te zijn, bijvoorbeeld in vergelijking met tarbot. Hematocriet van tarbot varieert van 11% tot circa 25% (Pichavant *et al.*, 2002; Person-Le Ruyet *et al.*,

2002; Cal *et al.*, 2005; Quentel en Obach, 1992). Wel is bekend dat stressvolle omstandigheden door hoge ammoniagehalten niet leiden tot verandering in hematocrietgehalten in Atlantische tong (Weber *et al.*, 2008). De resultaten van dit experiment zijn daarmee in overeenstemming.

#### *Parasitaire infecties*

De resultaten van de bemonstering op huidparasieten wijzen op grote verschillen tussen de behandelingen. Verschillen in parasitaire infecties tussen de kweeksystemen kunnen een groot deel van de waargenomen verschillen in groei en cortisol niveau's in het bloedplasma tussen kweeksystemen verklaren. In het algemeen hebben parasitaire infecties in vissen gevolgen voor groei, overleving en voortplanting van de gastheer. Parasieten benutten energiereserves van de gastheer en het energieverbruik van de gastheer kan nog verder stijgen wanneer de parasieten de gastheer belemmeren in zijn bewegingen. Daarnaast verbruikt het immuunsysteem van een gastheer meer energie door de parasitaire infectie. Vissen met een parasitaire infectie kunnen daardoor minder energie in groei steken. Parasitaire infecties beïnvloeden in veel gevallen ook het gedrag van de gastheer. De voeropname kan zowel toenemen als afnemen. Vissen kunnen meer gaan eten om de energetische kosten van de parasitaire infectie te compenseren. Vissen kunnen ook minder gaan eten door een algeheel gevoel van malaise als gevolg van de infectie (Barber *et al.*, 2000). De lagere groei van de tongen in RAS ten opzichte van BRON zijn mogelijk het gevolg van een lagere benutting van energie ten behoeve van groei door de hogere infectiegraad van huidparasieten. De hogere voederconversie in RAS bij min of meer gelijke voeropname toont aan dat inderdaad minder energie benut werd voor groei in RAS. Daarnaast werd in een ander, later uitgevoerd voerexperiment in dezelfde experimentele opstelling, met hetzelfde voer en met vissen afkomstig uit dezelfde partij in RAS een groei bereikt die gelijk was aan de groei in BRON in het huidige experiment. Dit laat zien dat groei in RAS niet noodzakelijkerwijs lager is dan in BRON. Mogelijk leidt een parasitaire infectie vanaf een zekere infectiedruk ook tot chronische stress gezien de hogere cortisolgehalten gemeten in MIX en RAS. De verschillen in parasitaire infecties komen niet tot uiting in de gemeten immunologische parameters tussen de behandelingen: verschillen in miltindex en leucocriet tussen behandelingen werden niet waargenomen. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de gebruikte immunologische parameters niet beïnvloed worden door parasitaire infecties dan wel dat gevoeligheid van deze parameters te beperkt was om verschillen in activiteit van het immuunsysteem vast te stellen.

#### 7.5 Conclusies

De resultaten van dit experiment tonen aan dat het recirculeren van kweekwater gevolgen kan hebben voor de groei en gezondheid van de gekweekte tong. Het recirculeren van het kweekwater leidde in dit experiment bij tong tot een lagere groei als gevolg van een slechtere voerbenutting en waarschijnlijk tot chronische stress. Dit systeemeffect op zowel groei als stress werd waarschijnlijk (mede) veroorzaakt door de in dit experiment hogere infectiedruk van huidparasieten in het recirculatiesysteem. De resultaten suggereren daarmee dat er een nauwe relatie bestaat tussen enerzijds de groei en gezondheid van kweekvis in recirculatiesystemen en anderzijds de samenstelling van microbiologische populaties in het recirculatiesysteem. De vraag of in afwezigheid van huidparasieten het recirculeren van kweekwater een effect heeft op de groei en gezondheid van tong kan niet beantwoord worden.

## 8. Het effect van sorteren op voeropname en gedrag van tarbot

Edward Schram en Jan van der Heul  
Wageningen IMARES, Afdeling Aquacultuur

### 8.1 Inleiding

Vissen communiceren onderling door uitscheiding van stoffen die via het water soortgenoten bereiken. Deze chemische communicatie werd voor het eerst aangetoond in 1932 en sindsdien is slechts een klein aantal van de betrokken stoffen geïdentificeerd. Chemische communicatie is met name onderzocht in zoetwatervissen en inmiddels aangetoond voor een tiental families waaronder cypriniden, zalmachtigen en *clarias*-achtigen (Corkum en Belanger, 2007) en relatief recent ook voor een (mariene) zeebrasemsoort (Olivotto *et al.*, 2002). Duidelijk is dat chemische communicatie een belangrijke rol speelt in veel aspecten van het gedrag en ontwikkeling van vissen (Solomon, 1976).

Chemische communicatie tussen vissen speelt mogelijk ook een rol bij het kweken van vis in recirculatiesystemen. Recirculatiesystemen bestaan over het algemeen uit meerdere tanks waarin verschillende groepen vissen gehuisvest zijn. De effluenten van afzonderlijke tanks komen samen in de waterzuivering van het kweekstelsel en het water wordt vervolgens teruggepompt naar de tanks. Het instroomde water van een tank bestaat daardoor uit een mengsel van gezuiverde effluenten van andere tanks binnen hetzelfde recirculatiesysteem. Dit betekent dat de vissen in verschillende tanks binnen een recirculatiesysteem weliswaar fysiek van elkaar gescheiden zijn maar doordat hetzelfde water gedeeld wordt, via het systeemwater met elkaar in verbinding staan. Lokaal geproduceerde chemische signalen bereiken daardoor mogelijk ook andere groepen vissen in andere tanks. Verschillen in leeftijd, grootte, huisvesting en behandeling van groepen vissen binnen een recirculatiesysteem kunnen er toe leiden dat in de ene tank wel chemische signaalstoffen worden geproduceerd en in de andere niet. Ook het bereiken van geslachtsrijpheid, een hogere bezettingsdichtheid, het sorteren van vissen of het op andere wijze behandelen van vissen waardoor een stress-reactie ontstaat kunnen leiden tot lokale productie van chemische signalen in recirculatiesystemen. Doordat alle tanks binnen een recirculatiesysteem met elkaar in contact staan, kunnen vissen die zich in een tank bevinden waarin de omstandigheden geen aanleiding geven tot de productie van chemische signalen, hier toch mee in aanraking komen. Dit heeft mogelijk een effect op het gedrag of de groei van deze vissen. Omdat kennis op dit terrein vrijwel ontbreekt, is in het huidige experiment onderzocht of het sorteren van tarbot leidde tot veranderingen in de voeropname en het gedrag van tarbot die niet gesorteerd werden maar wel via het water in contact stonden met gesorteerde tarbot.

### 8.2 Materialen en methoden

Het huidige experiment is een verkennende studie naar effecten van lokaal geproduceerde chemische signalen op het gedrag van vissen in hetzelfde recirculatiesysteem. Gedrag is gekozen als belangrijkste parameter vanwege de verwachte gevoeligheid voor de aanwezigheid van chemische signalen.

Het experiment is uitgevoerd in twee recirculatiesystemen die verschillen in de mate van verversing van het kweekwater. Een lagere verversing leidt naar verwachting tot een hogere accumulatie van in het systeem geproduceerde chemische signalen in het kweekwater en daarmee tot grotere effecten op de vissen.

#### *Experimentele opzet*

Voor de uitvoering van dit experiment zijn in elk van de twee experimentele recirculatiesystemen bij France Turbot drie experimentele tanks opgenomen. De twee experimentele recirculatiesystemen, RAS1% en RAS5%, verschillen in de mate van verversing van het kweekwater met bronwater, en worden beschreven in hoofdstuk 6. Het experiment is gelijktijdig en op dezelfde wijze uitgevoerd in beide recirculatiesystemen.

De experimentele tanks, kunststof tanks van 50L, werden doorstroomd met systeemwater dat rechtstreeks afkomstig was van de waterbehandelingen van de recirculatiesystemen (Fig. 8.1). De experimentele tanks werden met zwart doek afgeschermd van de rest van de ruimte om te voorkomen dat de aanwezigheid van mensen ten behoeve van het sorteren van de tarbot leidde tot verstoring van de tarbot in de experimentele tanks.

Elke tank werd bezet met 10 tarboten met een gemiddeld gewicht van  $54.9 \pm 3.3$ g. De vissen werden 's morgens en 's middags handmatig gevoerd op een niveau van ca. 1% van het lichaamsgewicht per dag.

### *Stress*

De maandelijkse routinematige bemonstering van de vissen in het recirculatiesysteem werd gebruikt als potentiële bron van stress voor de vissen in de experimentele tanks. Tijdens routinematige bemonstering van een tank in het recirculatiesysteem werd de tank middels een hek opgedeeld in twee compartimenten, waarbij alle vis bijeengedreven werd in een van de compartimenten. Vervolgens werd circa een kwart van het vissenbestand een voor een met een net verwijderd, individueel gewogen en teruggeplaatst in het andere compartiment. De stressfactoren bestonden daarmee uit opdrijving achter een hek voor het hele visbestand en daar bovenop het met een net uit het water verwijderen en het hanteren van de vis ten behoeve van het wegen voor circa een kwart van het visbestand.

Alle zes tanks in een recirculatiesysteem werden op deze manier in een periode van ca. 6 tot 8 uur bemonsterd. Tijdens het experiment zijn de recirculatiesystemen beide vier keer bemonsterd.

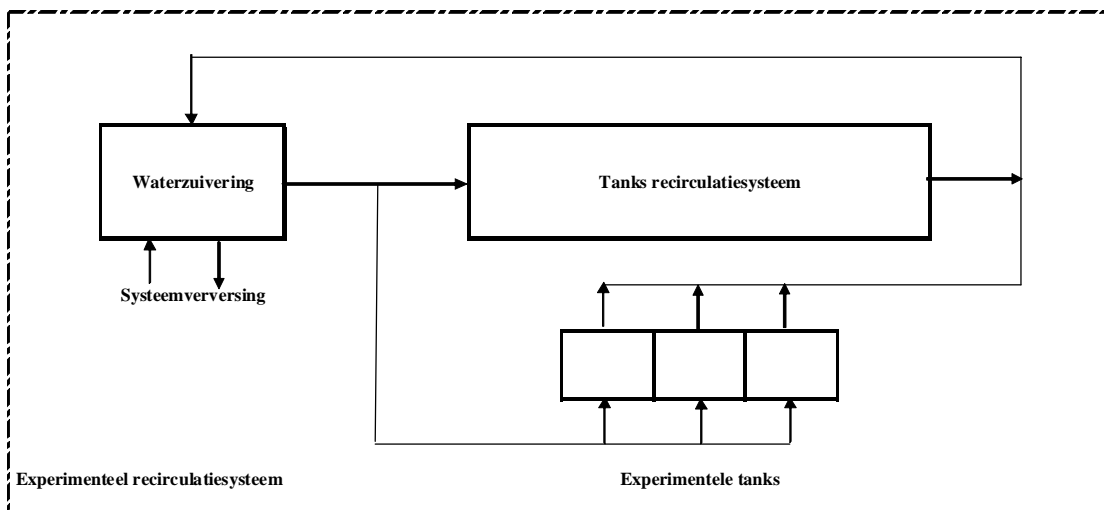


Fig. 8.1 Schematische weergave van de experimentele opstelling.

### *Productieparameters*

De voergift per tank werd dagelijks gedocumenteerd. Het dagelijkse voerverlies per tank werd bepaald door aan het einde van de dag de niet opgegeten voerpellets uit de experimentele tanks te verwijderen, te tellen en om te rekenen naar hoeveelheden voer. De voeropname volgt uit het verschil tussen voergift en voerverlies.

Bij de start en aan het einde van het experiment zijn alle vissen in de experimentele tanks individueel gewogen (Acculab L-senes LT 3200).

De specifieke groeisnelheid per tank is berekend op basis van de gemiddelde gewichten per tank bij start en einde van het experiment.

De variatiecoëfficiënt, een maat voor de spreiding van de individuele gewichten binnen een groep, is berekend voor de start en het einde van het experiment op basis van het gemiddelde gewicht per tank en de standaard deviatie per tank. De verandering in de spreiding van individuele gewichten per tank gedurende het experiment volgt uit het verschil tussen de variatiecoëfficiënt bij de start en aan het einde van het experiment.

De voederconversie per tank is berekend op basis de toename van de totale biomassa per tank en de totale voergift per tank gedurende het experiment.

### *Gedragparameters*

Zwemgedrag is vastgelegd met behulp van video-opnamen. Recht boven elke tank werd een camera (CCTV system) gehangen. Alle camera's waren verbonden aan een digitale videorecorder (SANYO DSR-3716PA) waarmee gelijktijdig van alle tanks video-opnamen gemaakt konden worden. Video-opnamen zijn gemaakt gedurende zeven dagen voor en na de routinematige bemonsteringen van de vissen in de recirculatiesystemen, en op de bemonsteringsdag zelf. Tijdens de opname dagen werden van 8.00 uur 's morgens tot 8.00 uur 's avonds elk uur gedurende 10 minuten video-opnamen gemaakt.

Voeropnamegedrag is gemeten als *Latency to feed intake*: de tijd tussen het op het water vallen van de eerste voerpellet en het ophappen van de eerste pellet door een vis. De *Latency to feed intake* is handmatig met een stopwatch gemeten voor en na de routinematige bemonsteringen van de vissen in de recirculatiesystemen, en op de bemonsteringsdagen zelf. Op de monsterdagen is de *Latency to feed intake* gemeten *nadat* de vissen in de recirculatiesystemen routinematig bemonsterd werden.

Wanneer de vissen in een tank na 60 seconden nog niet hadden gereageerd op het voer werd de observatie gestopt en gedocumenteerd als *No Response*.

#### *Waterkwaliteit en debieten*

Waterkwaliteit werd gemeten om de experimentele omstandigheden te bewaken. Zuurstof en watertemperatuur (Oxyguard Handy Gamma) werden vijfmaal per week gemeten, pH (Hach Lange HQ 40D) en totaal ammonium stikstof (TAN) (fotometrisch) eenmaal per week. De debieten over de experimentele tanks werden wekelijks gemeten door de tijd waarin een 1L maatbeker gevuld werd te meten. Tabel 8.1 geeft een overzicht van de experimentele omstandigheden.

Tabel 8.1. Gemiddelden en standaard deviaties voor het debiet (n = 21 per tank), zuurstofverzadiging (n = 100 per tank), pH (n = 15 per systeem), totaal ammonia (n = 15 per systeem) en de temperatuur (n = 100 per tank) voor de experimentele tanks gekoppeld aan RAS1% en RAS5%.

Parameter	RAS1%	RAS5%	P-waarde
Debiet (L/min)	50.1 (1.7)	50.5 (2.0)	0.40
Zuurstofverzadiging (%)	175 (21)	178 (23)	0.40
pH range	6.96 – 7.40	7.21 -7.52	-
Total ammonia (mg N/L)	0.76 (0.40)	0.46 (0.26)	-
Temperatuur	15.9 (2.8)	16.1 (2.3)	-

#### *Data analyse*

Voor de statistische analyse van de data werd gebruik gemaakt van GenStat 10.1. Verschillen werden significant beschouwd wanneer  $P < 0.05$ , tenzij anders is vermeldt.

Verschillen in gemiddelde specifieke groeisnelheid, totale voeropname, variatiecoëfficiënten en voederconversie van de vissen in de experimentele tanks tussen de beide recirculatiesystemen zijn met *One-way ANOVA* op significantie getoetst.

Het effect van de routinematige bemonstering van vissen in de recirculatiesystemen op de voeropname door de vissen in de experimentele tanks is afzonderlijk voor elk van beide recirculatiesystemen vastgesteld. Voor elke monsterdag is de gemiddelde voeropname op de dagen rondom de monsterdag in beschouwing genomen. Met behulp van *One-way ANOVA* en *post hoc* analyse is vastgesteld voor welke van deze dagen de voeropname verschilde van de voorgaande dag.

Het effect van de routinematige bemonstering van de vissen in het recirculatiesysteem (stressgebeurtenis) op het voeropnamegedrag (*latency to feed intake*) zijn geanalyseerd door de data van een even lange periode voor en na de stressgebeurtenis rond een stress gebeurtenis te analyseren onder het *splitplot* model voor een overal voor/na effect.

$$\text{Response} = c + \text{tank}_i + \text{voor/na}_j + e_{ij} + e_{ijk},$$

en voor een systeem specifiek voor/na effect

$$\text{Response} = c + \text{systeem}_i + \text{tank}_j + \text{voor/na}_k + \text{systeem} * \text{voorna}_{ik} + d_{ijk} + d_{ijkl},$$

Hierin stellen  $\text{tank}_i$  en  $\text{voor/na}_j$  voor het effect van tank  $i$  en voor/na niveau  $j$  ( $j=1$  = voor en  $j=2$  = na de stressgebeurtenis).  $e_{ij}$  is de toevalsbijdrage (tank v voor/na interactie) waar tegen voor/na effect is getoetst en  $e_{ijk}$  is de toevalsbijdrage voor dag  $k$  binnen tank  $i$  in periode  $j$ . Aangenomen wordt dat de toevalsbijdragen onderling onafhankelijk normaal verdeeld zijn met gemiddelde nul en variantie gelijk aan  $\sigma_{\text{periode} \cdot \text{tan } k}^2$  en  $\sigma^2$  respectievelijk.

Deze analyse toetst verschil in gemiddelde reactie tijd in de periode voor en die in de periode na de stressgebeurtenis.

De dataset bevat een groot aantal waarnemingen van reactietijden langer dan 60 seconden welke gedocumenteerd zijn als *No Response*. Deze meetwaarden zijn omgezet in een reactietijd van 60 seconden. Met de Genstat procedure CENSOR zijn deze gecensoreerde metingen van 60 seconden vervolgens vervangen door de geschatte waarde volgens de methode beschreven door Taylor (1973). Omdat de CENSOR procedure in Genstat alleen bruikbaar is voor datasets met gelijke aantallen waarnemingen voor en na de stressgebeurtenis data, kan deze alleen gebruikt worden voor dag 142 en niet voor de andere stressgebeurtenissen. Voor stressgebeurtenis op dag 142 is nader gekeken naar verschil in gemiddelde reactie tijd in de periode van 3 dagen voor dag 142 en die 3 dagen na dag 142. In deze perioden is 3 keer sprake van een gecensoreerde reactietijd van minimaal 60 seconden. Met *Two way ANOVA* zijn log getransformeerde *Latency to feed intake* data getoetst op voor/na effecten van de stressgebeurtenis en systeem effecten.

### 8.3 Resultaten

#### *Voeropname*

In de figuur 8.2 A t/m F wordt ingezoomd voeropname op de dagen rondom drie maandelijkse routinematige bemonstering in de beide recirculatiesystemen. In het meest gesloten recirculatiesysteem (RAS1%) werden rondom de eerste (Dag 49) en tweede monsterdag (dag 112) geen verschillen waargenomen in de voeropname van de experimentele vissen in RAS1% (Fig. 8.2A,  $P=0.27$  en Fig 8.3C,  $P = 0.82$ ). Op de derde monsterdag (Dag 142) bestonden wel verschillen in voeropname tussen de dagen rondom de bemonstering ( $P = 0.01$ ), echter tussen opeenvolgende dagen werden geen verschillen waar genomen (Fig. 8.2E).

In het minder gesloten recirculatiesysteem (RAS5%) was rondom de eerste monsterdag (Dag 49) alleen de voeropname op dag 46 hoger dan op dag 45 ( $P = 0.07$ , Fig. 8.2B). Rondom de tweede monsterdag (Dag 112) werden geen verschillen waargenomen ( $P = 0.24$ ). Rondom de derde monsterdag (dag 142) werden wel verschillen in voeropname waargenomen ( $P < 0.001$ ). De voeropname drie en vier dagen na de bemonstering is echter niet significant lager dan de voeropname op de dag voor de bemonstering.

#### *Voeropnamegedrag*

De gemeten reactiesnelheden van de tarbotten op het voer worden weergegeven in Fig. 8.3 voor de drie herhalingen per systeem. Een effect op het voeropnamegedrag voor en na De stressgebeurtenis op dag 142 van het experiment had geen effect op het voeropnamegedrag op de dagen erna: het voeropnamegedrag voor en na de stressgebeurtenis was gelijk (*Two way ANOVA*,  $P= 0.09$ ). Ook was er geen systeemeffect op het voeropnamegedrag voor en na de stressgebeurtenis (*Two way ANOVA*,  $P= 0.16$ ).

#### *Zwemactiviteit*

De zwemactiviteit van de vissen in de experimentele tanks werd vastgelegd middels video-opnamen. De gebruikte digitale video-recorders bleken echter niet bestand tegen de vochtige en zoute omgeving waarin de opnamen gemaakt moesten worden en zijn tijdens het experiment defect geraakt. De reeds vastgelegde opnamen bleken niet meer toegankelijk, waardoor geen resultaten van zwemactiviteit gerapporteerd kunnen worden.

#### *Productieparameters*

Het begingewicht van de vissen in de experimentele eenheden verschilde niet tussen de twee recirculatiesystemen (Tabel 8.2). De mate van verversing van het systeemwater van het recirculatiesysteem waarin de experimentele eenheden waren opgenomen (RAS 1% en RAS5%) had geen effect op het eindgewicht, de specifieke groeisnelheid, de voederconversie en de spreiding in de gemiddelde gewichten van de vissen in de experimentele eenheden (Tabel 8.2).

Tabel 8.2 Gemiddeld (n = 3) begingewicht, eindgewicht, specifieke groeisnelheid (SGR), voederconversie, toename van de spreiding van de gemiddelde gewichten ( $\Delta CV$ ) en de overleving in de experimentele tanks verbonden aan de beide recirculatiesystemen (RAS 1% en RAS 5%).

Parameter	Eenheid	RAS 1%	RAS 5%	P-waarde
Begingewicht	(g)	52.7 (1.8)	57.0 (3.2)	0.11
Eindgewicht	(g)	140.5 (29.7)	157.4 (18.2)	0.44
SGR	(%/d)	0.63 (0.16)	0.66 (0.04)	0.77
Voederconversie		1.62 (0.37)	1.54 (0.22)	0.77
$\square CV$	(%)	19.7 (10.7)	24.2 (8.6)	0.60
Overleving	(%)	100	100	-

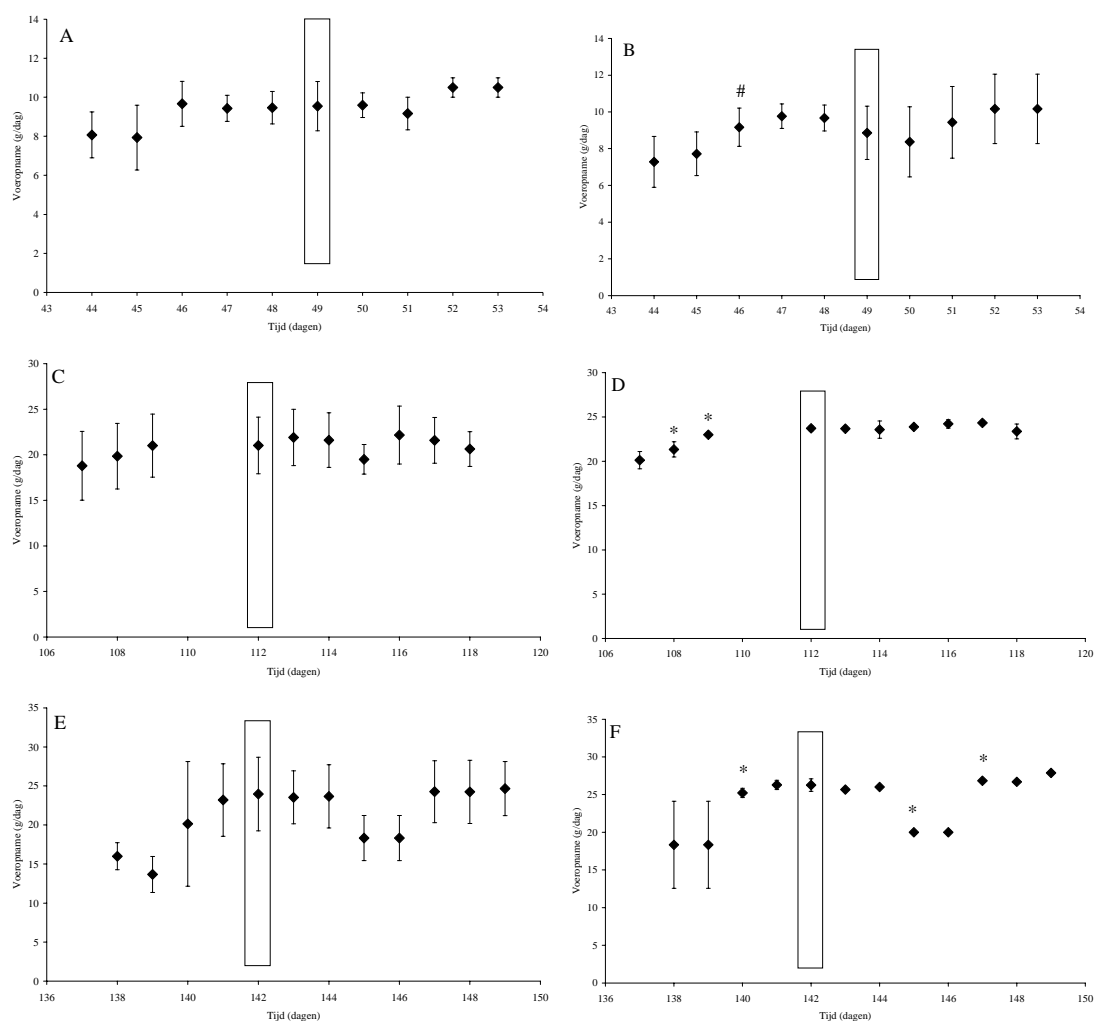


Fig. 8.2. Dagelijkse gemiddelde voeropname (n = 3) door juveniele tarbot rondom drie routinematige bemonsteringen (Dag 49, A en B; Dag 112, C en D; Dag 142, E en F) van soortgenoten in hetzelfde recirculatiesysteem, voor twee recirculatiesystemen (RAS1%, A,C,E; RAS5%, B,D,F). Meetwaarden gemarkeerd met (\*,  $P < 0.05$ ) en (#,  $P < 0.10$ ) verschillen van voeropname op de voorgaande dag. De dag waarop de routinematige bemonstering is uitgevoerd is omkaderd.

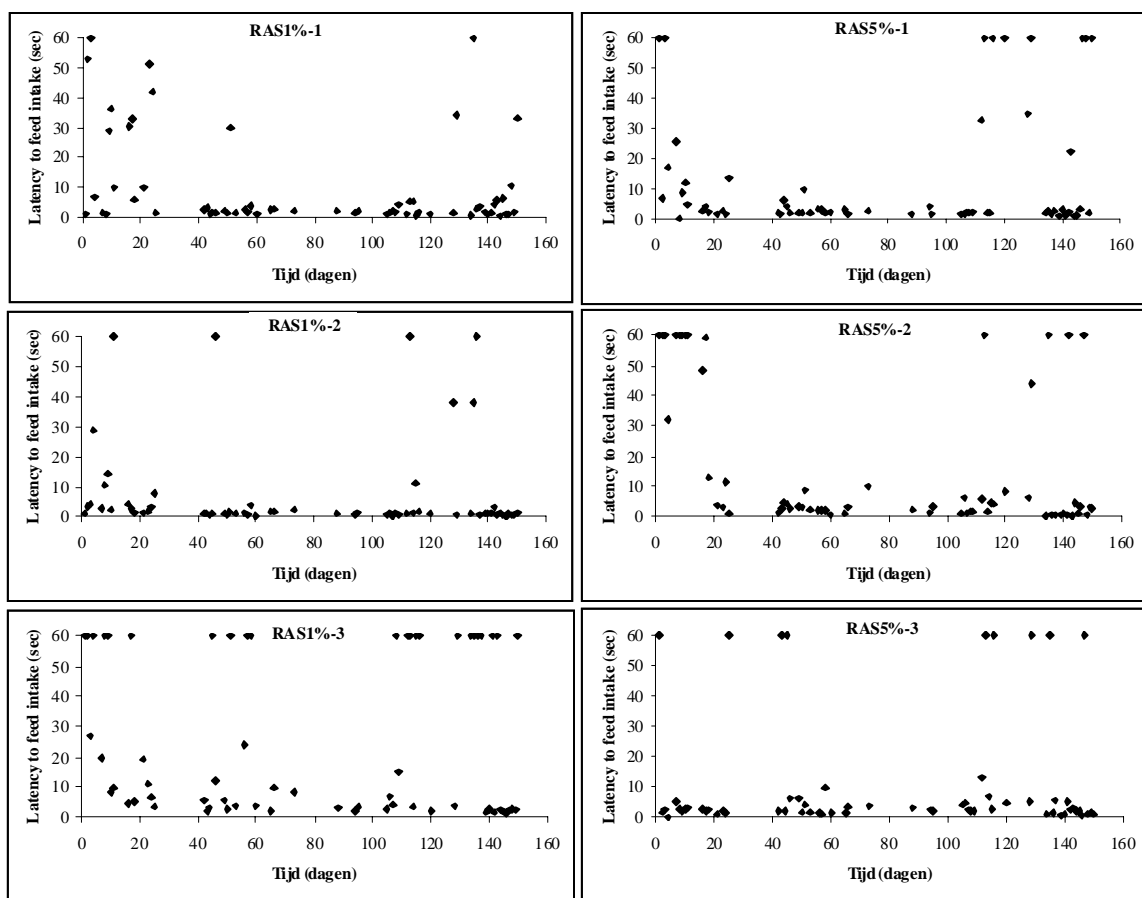


Fig. 8.3 Voeropnamegedrag uitgedrukt als de reactiesnelheid (sec) op het aanbieden van voer (*Latency to feed intake*). Weergegeven worden de gemeten reactietijden voor de drie herhalingen in beide kweeksystemen.

#### 8.4 Discussie

Dit experiment had als doel het vaststellen van de effecten op het gedrag en de voeropname van tarbotten van het hanteren van tarbot elders in hetzelfde recirculatiesysteem. Daarnaast was het vaststellen van het effect van de mate van verversing van het kweekwater in het recirculatiesysteem op de bovengenoemde effecten. Voorafgaand aan het experiment verwachtten we dat het hanteren van tarbotten leidde tot de productie en afscheiding van stoffen aan het water, bijvoorbeeld cortisol, en dat de niet gestresste experimentele vissen hierop zouden reageren. De mate waarin de experimentele vissen zouden reageren zou kunnen verschillen tussen de beide recirculatiesystemen vanwege verschillen in concentraties van de signaalstoffen als gevolg van het verschil in de mate van systeemwaterverversing.

In het experiment is echter in geen van beide recirculatie systemen een reactie van de experimentele vissen waargenomen: het samendrijven, de tank scheppen, wegen en terugplaatsen van grote tarbotten had geen effect op de voeropname en voeropnamegedrag van juveniele tarbotten in hetzelfde recirculatiesysteem. Dit is een belangrijke bevinding die er op wijst dat tarbotkwekers binnen een recirculatiesysteem vissen kunnen hanteren zonder dat dit via signaalstoffen negatieve gevolgen heeft voor de andere groepen vissen in hetzelfde recirculatiesysteem. Het is echter niet uitgesloten dat het sorteren van vissen in een systeem niet op andere wijze niet gesorteerde vissen kan verstoren, bijvoorbeeld als gevolg van geluiden, trillingen of bewegingen die de sorteeractiviteit met zich meebrengen. Een dergelijk effect beperkt zich niet tot een RAS, maar betreft alle tanks die aan de verstoring blootstaan.

Opvallend is dat het tilapia-experiment (hoofdstuk 5) leidde tot hetzelfde resultaat, ook daar werd geen reactie waargenomen. Voor de tilapia werd gesuggereerd dat de chemische signaalstoffen mogelijk werden gebonden aan de in het recirculatiesysteem aanwezige humuszuren en daardoor niet door de experimentele vissen konden worden waargenomen. Ditzelfde mechanisme kan ook een rol gespeeld hebben in het huidige tarbotexperiment. Overeenkomstig de praktijk waren de experimentele tanks niet rechtstreeks op het effluent van de tarbot tanks



aangesloten maar passeerde dit effluent eerst de waterzuivering. Omzetting van de signaalstoffen in het biologische filter inactieve stoffen is daarom ook een mogelijke verklaring voor het huidige resultaat. Een andere mogelijk verklaring is dat de experimentele juveniele vissen niet gevoelig zijn voor de signaalstoffen van hun volwassen soortgenoten. Een te lage concentratie van de signaalstoffen is onwaarschijnlijk vanwege de hoge biomassa en het kleine watervolume in een kweeksituatie ten opzichte van een natuurlijke situatie waarin signaalstoffen ook effectieve concentraties kunnen bereiken. De groei van de experimentele vissen verschilde niet tussen de beide recirculatiesystemen. Dit onderbouwt de eerder gevonden resultaat (Hoofdstuk 6) dat er geen verschil is in groei van tarbot in RAS1% en RAS5%.

## 8.5 Conclusies

Het sorteren van tarbotten heeft geen effect op de voeropname en het voeropnamegedrag van juveniele tarbot in hetzelfde recirculatiesysteem.

## 9 Workshop duurzame recirculatie

Rian Schelvis, Edward Schram, Oliver Schneider en Henk van der Mheen  
Wageningen IMARES, Afdeling Aquacultuur

### 9.1 Inleiding

Als onderdeel van het LNV bestek Duurzame Viskweek heeft IMARES samen met AFI een workshop georganiseerd waarmee de projectresultaten gepresenteerd werden aan de Nederlandse viskweeksector.

### 9.2 Programma en opzet

Het programma van de workshop wordt weergegeven in Tabel 9.1. Het centrale thema van de workshop was Duurzaamheid in de recirculatie. Daaromheen wordt het programma ingedeeld in drie thema's: Welzijn, Milieu en Markt, met daarin de onderstaande elementen:

- Welzijn: waterkwaliteit, groei en operationele welzijnsindicatoren.
- Milieu: waste management en reductie van uitstoot.
- Markt: economische informatie ten behoeve van keuzes voor de toekomst. Consumenten en duurzame vissteelt.

Verschillende sprekers uit Nederland hebben de thema's toegelicht met de meest actuele informatie uit onderzoeken. De presentaties zijn terug te vinden op [www.aquacultuur.nl](http://www.aquacultuur.nl).

Tabel 9.1 Programma workshop 28 oktober 2008

Tijd	Spreker	Onderwerp
9.30-10.00		Ontvangst met koffie/thee
10.00-10.20	Leo Jansen (Stichting Noordzee)	Introductie Duurzaam
10.20-10.40	Catarina Martins & Ep Eding (AFI)	Projectresultaat LNV Bestek
10.40-11.00	Edward Schram (IMARES)	Projectresultaat LNV bestek
11.00-11.20	Hans van de Vis & Marnix Poelman (IMARES)	Operationele welzijn indicatoren (duurzaamheidsmeetlat)
11.20-11.40		Koffie
11.40-12.00	Ep Eding (AFI) & Olivier Schneider (IMARES)	Waste management
12.00-12.20	Hans van Oostenbrugge (LEI)	Marktontwikkeling voor duurzame recirculatie
12.20-12.50	Adriaan Kole (AFSG)	Consumenten en duurzame vissteelt
12.50 – 13.50		Lunch
14.00 – 15.30	o.l.v Edward Schram en Henk van der Mheen	Workshop: De toekomst van Duurzame RAS
15.30 – 16.10		Samenvatting en conclusie
16.10-16.30		Afsluitende borrel

Na de presentaties over de actuele kennis werd een workshop gehouden over de toekomst van duurzame recirculatie teelt in Nederland. De deelnemers werden in vijf groepen ingedeeld en elke groep had de opdracht een projectvoorstel te laten maken. De projecten moesten bijdragen aan verdere verduurzaming van de Nederlandse recirculatie teelt. In elke groep zaten zoveel als mogelijk gelijk verdeeld vertegenwoordigers van de viskwekers (V), de onderzoekers (O) en beleidsmakers (B) en was vooraf vastgesteld. De vijf projectvoorstellen werden vervolgens aan alle deelnemers gepresenteerd. Daarna hadden alle individuele deelnemers de mogelijkheid om drie stickers te plakken, waarmee de waardering voor de voorstellen kon worden weergegeven.

De keuze was aan de deelnemers of ze met de stickers 1, 2 of 3 projectvoorstellen waardeerden. Door gebruik te maken van verschillend gekleurde stickers kon de waardering onderscheiden worden naar de achtergrond van de deelnemers (viskweker, onderzoek, beleid). Doordat in totaal 30 deelnemers drie stemmen uit konden brengen, waren in totaal 90 stemmen te verdelen over de vijf projecten.

### 9.3 Resultaten

Een overzicht van de vijf projecten wordt weergegeven in Tabel 9.2. Figuur 9.1 geeft de waardering per project weer door deelnemers aan de workshop.

Tabel 9.2 Projectvoorstellen

Project 1	<b>Objectieve meting aquacultuur NL versus Buitenland</b>		
Deelnemers	Toos	Hurk van de	?
	Frans	Aartsen	V
	Alfred	Boet	O
	Stephan	Dingemans	V
	Wim	Eijk van	B
	Kees	Kloet	V
	Oliver	Schneider	O
	Job	Steenbergen van	V
	Pim	Wilhelm	V
Probleem	Imago		
Doel	Consument beschermen		
	Bestaansrecht aquacultuur benadrukken		
	Overheid informeren		
Onderzoek	Wetenschappelijk vergelijk van aquacultuur NL met andere landen/systemen.		
	Totaliteit import vis → overheid consument beschermen		
	Netto vervuiling per eenheid vis per kweekmethode		
Waardering: 11	Viskwekers: 9	Onderzoekers: 1	Beleidsmakers: 1
Project 2	<b>Image building NL kweekvis</b>		
Deelnemers	Hans	Oostbrugge van	O
	Justine	Herder de	B
	Willem	Kemmers	V
	Siem	Kox	V
	Hugo	Willems	?
	Edward	Schram	O
	Joost	Stroomer	V
Probleem	Onvoldoende onderscheidend tov import		
	Referentiekader ontbreekt		
Doel	Imago verbeteren NL kweekvis		
	Marktprijs verhogen ( <i>speciaal gewaardeerd bij het stickers plakken</i> )		
	Volume markt omhoog		
	Vraag naar NL kweekvis omhoog.		
Uitvoering	Promotiecampagne ala Melk de witte motor...snoep verstandig		
	Bewustwording bij consument/retail/groothandel		
Waardering: 22	Viskwekers: 15	Onderzoekers: 4	Beleidsmakers: 3

Project 3	<b>Markt promotie NL kweekvis</b>		
Deelnemers	Gerard	Beek van de	V
	Ep	Eding	O
	Rik	Kraaij van	B
	Gaston	Michielsen	V
		Dijkstra	
	Maarten Paul	Tellingen van	V
	Frans	Veenstra	O
	Hans	Wijst van der	V
Probleem	Consument niet op de hoogte van duurzame vis		
	Uitdaging: 2011 convenant supermarkten duurzame vis		
Doel	Duidelijke criteria voor duurzaamheid ontwikkelen		
	Door promotie duurzaam gekweekte vis stimuleren		
	Actievere rol v/d kwekers hierin		
Onderzoek	1 Wat is er al: Duurzaamheidscriteria (internationaal & Nationaal)		
	2 Op basis van alle betrokkenen: hoe duurzaam is de NL kweek al?		
	3 Hoe onderscheidt zich NL kweek v/h buitenland en de visserij (Life cycle analysis)		
	4 Hoe promoot je eigen product?		
Waardering: 19	Viskwekers: 9	Onderzoekers: 8	Beleidsmakers: 2
Project 4	<b>Hollands Nieuwste</b>		
Deelnemers	Victor	Bierbooms	V
	Jasper	Houcke van	O
	Marc	Intven	V
	Bas	Kuijk van	O
	Fred	Veenman	V
	Hans	Vis van de	O
	Jan	Willems	V
Probleem	Economische duurzaamheid		
Doel	Huidige aquacultuursector gezond maken voor de toekomst.		
Onderzoek	Regelgeving Nationaal en EU		
	Vermarkten (duurzaamheid, label/merk, RAS vs Open, supermarkten)		
	Samenwerking binnen de sector (belangenbehartiging op NL en EU niveau)		
	Groei naar 50 Kton in 5 jaar		
Waardering: 26	Viskwekers: 13	Onderzoekers: 10	Beleidsmakers: 3

Project 5	<b>Duurzaam samenwerken</b>		
Deelnemers	Steven	Demeulenaere	V
	Annemiek	Foolen	V
	Adri	Bout	V
	Adriaan	Kole	O
	Marnix	Poelman	O
	Geert	Putten van der	V
	Oleg	Salkazanov	V
	Peter	Werkman	O
Probleem	3P People, Profit Geen samenwerking Systemen niet huffer proof Geen ketenbeheersing		
Doel	Meer collega's – geen concurrenten Vernieuwing & stabiliteit stimuleren "innovatie"		
Onderzoek	Efficiënte educatie Begeleidings programma's Ontwikkelen robustere kweeksystemen Ketenbenadering + vermarkting + samenwerking Transparantie en kwaliteitslabel Geen toevoegingen monitoring		
Waardering: 12	Viskwekers: 8	Onderzoekers: 4	Beleidsmakers: 0

#### 9.4 Conclusies

Opvallend was dat zonder uitzondering de projectvoorstellen zich richten op het verbeteren van de markt voor duurzaam gekweekte producten. Blijkbaar heeft dit thema een hogere prioriteit dan de andere twee duurzaamheidsthema's milieu en welzijn. Verschillende aanpakken worden voorgesteld. Populair onder de viskwekers zijn die projectvoorstellen waarbij concreet voorgesteld wordt om de productie én de marktprijs te verhogen. Populair bij de onderzoekers zijn die voorstellen waarbij met systematisch gedocumenteerde gegevens die doelen bereikt kunnen worden.

Daarnaast viel op dat viskwekers over het algemeen van mening zijn dat de eigen productie in Nederland duurzamer is dan kweekvis geïmporteerd uit landen buiten de EU (pangasius, tilapia) en dat dit gegeven benut moet worden ten behoeve van het vergroten van het marktaandeel van Nederlandse kweekvis. Het ontbreekt echter aan een goede en objectieve vergelijking op duurzaamheid tussen in Nederland en buiten de EU geproduceerde kweekvis. De stelling dat Nederlandse kweekvis inderdaad duurzamer is, kan daarom onvoldoende onderbouwd worden om te gebruiken voor marketing. Onderzoek naar de werkelijke duurzaamheid van verscheidene (kweek) visproducten is daarom gewenst om een goede en objectieve vergelijking mogelijk te maken.

De manier waarop de workshop is georganiseerd werd in het algemeen als prettig ervaren door de deelnemers. Het was prettig om in kleinere groepen te discussiëren waarbij ieder zijn mening tot z'n recht kwam. Het werken in de vorm van projectvoorstellen was voor sommigen nog moeilijk.

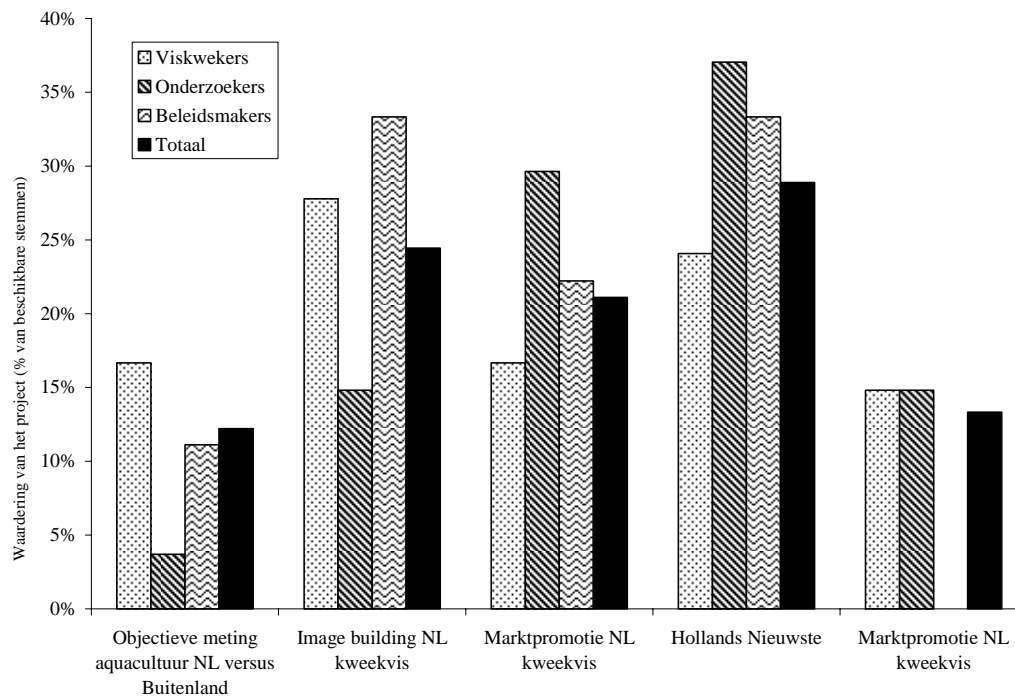


Fig. 9.1 De waardering voor de vijf projectvoorstellen door de deelnemers aan de workshop uitgedrukt als percentage van de beschikbare stemmen per achtergrond van de deelnemers (viskweker, onderzoeker, beleidsmaker) en als percentage van het totaal aantal beschikbare stemmen (90).

# 10 Wetenschappelijke productie van het project

## 10.1 Aquaculture and Fisheries Group

### Publicatie in double refereed tijdschrift

Martins, C. I. M., Pistrin, M., Ende, S., Eding E., Verreth, J. A. J. accepted. The accumulation of substances in Recirculation Aquaculture Systems (RAS) affect embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture

### Abstracts

Martins, C. I. M., Pistrin, M., Ende, S., Eding, E.H. and Verreth, J.A.J. 2008. The accumulation of substances in Recirculation Aquaculture Systems (RAS) affect embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture Europe 2008. Krakow, Poland, 15-18 September.

Martins, C. I. M., Ende, S., Eding, E.H. and Verreth, J.A.J. 2008. Stressing fish in Recirculating Aquaculture Systems: Does stress induced in one group of fish affect the feed intake and feeding motivation of other fish sharing the same RAS? Aquaculture Europe 2008. Krakow, Poland, 15-18 September.

Martins, C. I. M., Ende, S., Ochola, D., Eding, E.H. and Verreth, J.A.J. 2007. Growth retardation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in Recirculation Aquaculture Systems. Aquaculture Europe 2007. Istanbul, Turkey, 24-27 October.

### Presentaties

Martins, C. I. M., Pistrin, M., Ende, S., Eding, E.H. and Verreth, J.A.J. 2008. The accumulation of substances in Recirculation Aquaculture Systems (RAS) affect embryonic and larval development in common carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture Europe 2008. Krakow, Poland, 15-18 September.

Martins, C. I. M., Ende, S., Eding, E.H. and Verreth, J.A.J. 2008. Stressing fish in Recirculating Aquaculture Systems: Does stress induced in one group of fish affect the feed intake and feeding motivation of other fish sharing the same RAS? Aquaculture Europe 2008. Krakow, Poland, 15-18 September.

Martins, C. I. M., Ende, S., Ochola, D., Eding, E.H. and Verreth, J.A.J. 2007. Growth retardation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in Recirculation Aquaculture Systems. Aquaculture Europe 2007. Istanbul, Turkey, 24-27 October.

Eding, E.H. and Schneider, O. 2008. Waste management. Workshop Duurzame recirculatie teelt, De Zaethe, Yerseke, The Netherlands, 28 October 2008.

Eding, E.H. and Martins, C., 2008 Project resultaat LNV bestek duurzame visteelt. Workshop Duurzame recirculatie teelt, De Zaethe, Yerseke, The Netherlands, 28 October 2008

Ingediend als abstract en presentatie voor Aquaculture Europe 2009, Trondheim, Noorwegen

Martins, C. I. M., Eding, E. and Verreth, J.A.J. 2009. Do heavy metals accumulate in water and fish from Recirculating aquaculture Systems? Aquaculture Europe 2009. Tondheim, Norway, 14-17 August.

Martins, C. I. M., Eding, E. and Verreth, J.A.J. 2009. Growth retardation in Recirculating aquaculture Systems: Myth or Reality? Aquaculture Europe 2009. Tondheim, Norway, 14-17 August.

## 10.2 Wageningen IMARES

### Publicatie in *double refereed* tijdschrift (in voorbereiding)

Schram, E., Van der Heul, J.W., Van der Vis, J.W., Jansen, J., Abbink, W., Schneider, O.  
The influence of system water refreshment rates on realized feed load, weight development, fish physiology and behavior in turbot.

### Presentaties

Het effect van recirculatie op groei, fysiologie en gedrag van tarbot. 2008. Project resultaat LNV bestek duurzame visteelt. Workshop Duurzame recirculatie teelt, De Zaethe, Yerseke, The Netherlands, 28 October 2008.

### Ingediend als *abstract* en presentatie voor Aquaculture Europe 2009, Trondheim, Noorwegen

Schram, E., Van der Heul, J.W., Van der Vis, J.W., Jansen, J., Abbink, W., Schneider, O.  
The influence of system water refreshment rates on realized feed load, weight development, fish physiology and behavior in turbot



## 11 Kwaliteitsborging

*[In dit hoofdstuk moet voor de afdeling Milieu in elk geval worden vermeld:*

- een vermelding dat CRM en/of IRM gebruikt zijn voor de kwaliteitsborging. Eventueel kan een overzicht van de resultaten worden gegeven onder vermelding van het gemiddelde gehalte cq. de gecertificeerde waarde van het IRM cq CRM.*
- Een vermelding dat is deelgenomen aan ringonderzoek. Eventueel kan een overzicht van de behaalde Z/scores worden opgegeven.*
- Een vermelding van een aantal validatieparameters )detectiegrens, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid' Deze kunnen uit het validatierapport van de bepaling gehaald worden. Daarbij verdient het aanbeveling om na te gaan of deze gegevens nog relevant zijn binnen het uitgevoerde onderzoek. Het kan bijvoorbeeld voorkomen dat de detectiegrens in het onderzoek anders ligt dan in de validatiestudie doordat er meer of minder monster is ingewogen.*
- Indien men geen gedetailleerde informatie verstrekt door validatieparameters kan worden volstaan met een verwijzing naar het kwaliteitshandboek van de afdeling Milieu.*

*Voor overige onderzoeken kan worden vermeld]*

IMARES beschikt over een ISO 9001:2000 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 08602-2004-AQ-ROT-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2009. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Het laatste controlebezoek vond plaats op 23-25 april 2008. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling Milieu over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 27 maart 2009 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie. Het laatste controlebezoek heeft plaatsgevonden op 5 oktober 2007.

## Referenties

- Agradi, E., Baga, R., Cillo, F., Ceradini, S. and Heltai, D., 2000. Environmental contaminants and biochemical response in eel exposed to Po River water. *Chemosphere* 41, 1555-1562.
- Alderson, R. 1979. The effect of ammonia on the growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.) and turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 17, 291-309.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. 1999. The stress response of the gilthead seabream *Sparus auratus* L. to air exposure and confinement. *Journal of endocrinology* 163, 149-157.
- Barber, I., Hoare, D., Krause, J. 2000. Effects of parasites on fish behavior: a review and evolutionary perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 131-165.
- Boeuf et al., 1999. G. Boeuf, D. Boujard and J. Person-Le Ruyet, Control of the somatic growth in turbot. *J. Fish Biol.* 55 (1999), pp. 128-147.
- Brown, G.E., Adrian J.C. Jr., Lewis M.G., Tower J.M., 2002. The effects of reduced pH on chemical alarm signalling in ostariophysan fishes. *Can. J. Fish.* 59, 1331-1338.
- Cal, R.M., Vidal, S., Camacho, T., Piferrer, F., Guitian, F.J. 2005 Effect of triploidy on turbot haematology. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 141, p 35 – 41
- Corkum L.D., Belanger R.M., 2007. Use of chemical communication in the management of freshwater aquatic species that are vectors of human diseases or are invasive. *General and Comparative Endocrinology* 153. 401-417.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. 2008. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. *Aquaculture Research* 39, 1-9.
- Dave, G., Xiu, R., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 126-134.
- Goede, R. W. & B. A. Barton, 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Amer. Fish Soc. Symp.* 8: 93-108.
- Good, C., Davidson, J., Welsh, C., Snekvik, K., Summerfelt, S.T. 2008. Evaluating the health of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in recirculating systems operated under high feed and low flushing conditions. Page 134 In: *Aquaculture America 2008 Conference and Exposition*. February 9-12, Lake Buena Vista, Florida.
- Grosell, M., Jensen, F.B., 2000. Uptake and effects of nitrite in marine teleost fish *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 50, 97-107.
- Hepher, B., 1988. *Nutrition of Pond Fishes*. Cambridge University Press, Cambridge, 388 pp.
- Hubbard, P.C., Barata, E. N., Canario, A. V. M., 2002 Possible disruption of pheromonal communication by humic acid in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 60, 169 -183.
- Huguenin, J.E., Colt, J. 2002. Design and operating guide for aquaculture seawater systems. *Developments in aquaculture and fisheries science* 33. Elsevier.
- Hutchinson, T.H., Manning, M.J. 1996. Effect of in vivo cadmium exposure on the respiratory burst of Marine Fish (*Limanda limanda* L.) phagocytes. *Marine Environmental Research* 41 (4). P 327-342.
- Jensen, F.B., 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol., A* 135, 9-24.
- Kincheloe, J. W., Wedemeyer, G. A., Koch, D., 1979. Tolerance of developing salmonid eggs and fry to nitrate exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 575-578.
- Laiz-carrión, R., Martín Del Río, M.P., Miguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L. 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 298A (2), 105 – 118.
- Leduc A.O.H.C., Kelly J.M., Brown G.E., 2004. Detection of conspecific alarm cues by juvenile salmonids under neutral and weakly acidic conditions: laboratory and field tests. *Behavioural Ecology or Oecologia* 442, 1492-8.
- Luckenbach, T., Ferling, H., Gernhöfer, M., Köhler, H-R., Negele, R-D., Pfefferle, E., Triebkorn, R., 2003. Developmental and subcellular effects of chronic exposure to sub-lethal concentrations of ammonia, PAH and PCP mixtures in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario* L.) early life stages. *Aquat. Toxicol.* 65, 39-54.
- Martins, C. I. M 2005. Individual variation in growth of African catfish: a search for explanatory factors. PhD thesis, Wageningen University.

- McGurk, M.D., Landry, F., Tang, A., Hanks, C. C., 2006. Acute and chronic toxicity of nitrate to early life stages of lake trout (*Salvelinus namaycush*) and lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2187-2196
- Moore A., 1994. An electrophysiological study on the effects of pH on olfaction in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Journal of Fish Biology* 45, 493-502.
- Nayak, A. S., Lage, C. R., Kim, C. H., 2007. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio Rerio*). *Toxicol. Sci.* 98, 118-124
- Olivotto I., Mosconi G., Maradonna F., Cardinali M., Carnevali O., 2002. *Diplodus sargus* interregional-pituitary response: chemical communication in stressed fish. *General and Comparative Endocrinology* 126, 66-70.
- Person-Le-Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A. and Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 154, pp. 155-171.
- Person-Le Ruyet, J., Pichavant, K., Vacher, C., Le Bayon, N., Severe, A., Boeuf, G. 2002. Effects of O<sub>2</sub> supersaturation on metabolism and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *Aquaculture* 205, p373-383.
- Pichavant, K., Person-Le-Ruyet, J., Le Bayon, N. Sévère, A., Le Roux, A., Quémener, L., Maxime, V., Nonnotte, G., Boeuf, G. 2000. Effects of hypoxia on growth and metabolism of juvenile turbot. *Aquaculture* 188 (1-2) p. 103-114.
- Pichavant, K., Maxime, V., Thébault, M.T., Ollivier, H., Garnier, J. P., Bousquet, B., Diouris, M., Boeuf, G., Nonnotte, G. (2002) Effects of hypoxia and subsequent recovery on turbot *Scophthalmus maximus*: hormonal changes and anaerobic metabolism. *Mar Ecol Prog Ser* 225, p275-285.
- Quentel, C., Obach, C. 1992. The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology* 41, p709-716
- Siikavuopio, S.I., Sæther, B.S. 2006 Effects of chronic nitrite exposure on growth in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* *Aquaculture* 255 (1-4), p351-356.
- Solomon D.J., 1976. A review of chemical communication in freshwater fish. *Journal of Fish Biology* 11. 363-376.
- Taylor, J. 1973. The analysis of designed experiments with censored observations. *Biometrics*, 29, 35-43.
- Toor, H. S., Sehgal, H. S., Brar, C. S., 1983. Water-soluble phosphates: observed effects on embryonic development, hatching time, and survival of common carp. *Prog. Fish-Cult.* 45, 134-135.
- Tort, L., Montero, D., Robaina, L., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. S., 2001. Consistency of stress response to repeated handling in the gilthead sea bream *Sparus aurata* Linnaeus, 1758. *Aquac. Res.* 32, 593-598.
- Van Dam A.A., Beveridge, M.C.M., Azim, M.E. and Verdegem, M.C.J. 2002. The Potential of Fish Production based on Periphyton. *Review in fish biology and fisheries* 12, 1-31.
- Van Ham, E.H., Van Anholt, R.D., Kruitwagen, G., Imsland, A.K., Foss, A., Sveinsbø, B.O., FitzGerald, R., Parpoura, A.C., Stefansson, S.O., Wendelaar Bonga, S.E. 2003. Environment affects stress in exercised turbot. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 136, 525-538.
- Verdegem, M.C.J., Eding, E.H., Sereti, V., Munubi, R.N., Santacruz-Reyes and A.A. van Dam. 2005. Similarities between microbial and periphytic biofilms in aquaculture Systems. In: *Periphyton: Ecology, exploitation and management*. Azim, M. E., Verdegem, M. C. J., van Dam, A. A. and Beveridge, M. C. M. (ed). Cabi Publishing, 191-205.
- Weber, R.A., Pérez-Maceira, J.J., García Martín, L.O., Aldegunde, M., Peleteiro, J.B. 2008. Physiological stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) induced by acute exposure to exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* (151, 1), S17.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish *Physiological Reviews* 7, 591-625.

# Verantwoording

Rapport C019/09  
Projectnummer: 4394300101

## Verantwoording

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het betreffende afdelingshoofd van Wageningen IMARES.

Akkoord: Ir. H.W. van der Mheen  
Afdelingshoofd Aquacultuur



Handtekening:

Datum: 5 maart 2009

Aantal exemplaren:	14
Aantal pagina's:	86
Aantal tabellen:	26
Aantal figuren:	28